



Hinc patriam sustinet

Instituto Superior de Agronomia
Universidade Técnica de Lisboa



**Avaliação da influência da adubação azotada nítrica e
amoniacal no crescimento e na actividade de algumas
enzimas em oliveiras jovens
(*Olea europaea* L. cv Cobrançosa)**

Maria Pedro Mendes Gomes da Silva

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Agronómica

Orientador: Doutora Mariana da Silva Gomes Mota

Co-orientador: Professora Doutora Maria Odete Pereira Torres

Júri:

Presidente: - Doutora Cristina Maria Moniz Simões de Oliveira, Professora Associada do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Vogais: - Doutora Maria Odete Pereira Torres, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;
- Doutora Maria da Encarnação Ferreira Marcelo, Investigadora Auxiliar do Instituto Nacional de Recursos Biológicos, I.P.;
- Doutora Mariana da Silva Gomes Mota, Investigadora Auxiliar do Instituto Superior Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;
- Doutora Cláudia Sofia Batalha Neto

Lisboa, 2010

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar o meu profundo reconhecimento a todos aqueles que tornaram possível a realização deste trabalho. A todos eles deixo aqui o meu agradecimento sincero.

Em primeiro lugar agradeço à minha orientadora e amiga Doutora Mariana Mota pelo apoio, incentivo e constante disponibilidade na resolução dos diversos desafios colocados no decorrer deste trabalho. Gostaria ainda de agradecer à minha co-orientadora, a Professora Doutora Maria Odete Torres pela partilha do vasto conhecimento que possui, os seus critérios de exigência e eterna busca pelo rigor científico foram uma ajuda preciosa desde o começo deste desafio.

Ao Professor Doutor Cardoso Pinto pela disponibilização do espaço onde decorreram os ensaios, no Horto de Química Agrícola Boaventura de Azevedo, do Instituto Superior de Agronomia.

Aos técnicos de laboratório do Departamento de Química Agrícola e Ambiental, Sr. Domingos Figueiredo e Sr^a Dn^a Isabel Pina, que contribuíram para a realização das determinações analíticas.

À minha família e amigos, especialmente à minha mãe, aos meus primos Rodrigo e Alexandra e à Sofia pela ajuda, compreensão e paciência. Ao Francisco que me deu a motivação e a coragem necessárias para ultrapassar todas as dificuldades e conseguir saborear as pequenas vitórias.

RESUMO

Na cultura da oliveira estão pouco estudadas quais as formas e quantidades de azoto preferíveis em termos de produtividade e de impacto ambiental.

Neste trabalho estudou-se a influência da adubação azotada nítrica e amoniacal no desenvolvimento de jovens oliveiras (cv. Cobrançosa) e na actividade da nitrato-redutase (NR) e da glutamina-sintetase (GS), duas enzimas responsáveis pela fixação do azoto na planta (ensaio A), utilizando-se 4 níveis de azoto: N0 – 0 kg/ha, N1 – 30 kg/ha, N2 – 60 kg/ha e N3 – 90 kg/ha e 3 tipos de formulações nítrico-amoniacaís: 100:0 ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$), 50:50 (NH_4NO_3) e 0:100 ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). Noutro ensaio (B) avaliaram-se as perdas de N por lixiviação dos adubos azotados utilizados, testando-se 2 níveis de azoto, N0 e N3 e duas formulações, NH_4NO_3 e $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ por forma a avaliar as perdas de N por lixiviação dos adubos azotados utilizados.

Os resultados obtidos indicam que a adubação azotada não influenciou qualquer das características analisadas nas jovens oliveiras: características biométricas, teores foliares de azoto total e mineral e a actividade foliar da NR e da GS. No ensaio B o tratamento com NH_4NO_3 levou a menores perdas por lixiviação de ião nitrato e de ião amónio que o de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$.

Palavras chave: Formulações nítrico-amoniacaís, glutamina-sintetase, lixiviação de N, nitrato-redutase, níveis de N.

ABSTRACT

The effect of different levels and sources of nitrogen (N) is a well known theme among many species, but there haven't been many studies in this subject regarding olive trees.

We aimed to evaluate the impact of ammonium and nitrate fertilization on the development of young olive trees (cv. Cobrançosa) and its influence on the activity of two of the enzymes responsible for N assimilation, nitrate-reductase (NR) and glutamine-synthetase (GS) (experiment A), using 4 different N levels (N0 – 0 kg/ha, N1 – 30 kg/ha, N2 – 60 kg/ha and N3 - 90 kg/ha) and 3 $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ ratios (100:0 ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$), 50:50 (NH_4NO_3) and 0:100 ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)). In another experiment (B), we studied the potential losses through N leaching after 2 levels of N, N0 and N3, and 2 N-sources, NH_4NO_3 and $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, were added to the plants.

The results obtained suggest that, in the present study, the N-treatment showed no influence on plant growth, total N, NO_3^- and NH_4^+ status, NR or GS activity. In these experimental conditions N-fertilization appears not to have influenced the studied parameters. NH_4NO_3 treatment used in experiment B proved to be not as vulnerable as $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ treatment to ammonium and nitrate losses.

Keywords: ammonium and nitrate fertilization, olive tree, nitrate-reductase, glutamine-synthetase, N leaching

EXTENDED ABSTRACT

To satisfy market demands olive growers have to produce at maximum crop value and yield. The environmental costs of this policy such as water and soil pollution, soil and resources impoverishment have to be taken into consideration. Since nitrogen (N) is the mineral nutrient most commonly applied in olive (*Olea europaea* L.) orchards due to its importance in plant growth, limiting pollution by increasing plant N use efficiency, should represent our main concern.

Plant roots are exposed to nitrogen in a variety of different forms, but have limited capacity to take up the available forms at different rates. N uptake is mainly as nitrate (NO_3^-) and ammonium (NH_4^+) ions. It is acknowledged that the level and form in which inorganic N is taken up by plants, affect numerous of their physiological processes (Therios e Sakellariadis, 1988; Truax *et al.*, 1994). Plants response to ammonium or nitrate fertilization varies within species, plant age, temperature and light intensity (Mengel e Kirkby, 2001). Although the effect of different levels and sources of nitrogen is frequently studied for many species, when olive trees are concerned more information is needed.

Absorbed NH_4^+ is quickly assimilated into amino acids and proteins for storage in roots because low levels can cause NH_4^+ toxicity. In another hand, absorbed NO_3^- may be stored or assimilated into organic forms for storage in roots or transported in xylem exudates along with amino acids into leaves, where it is reduced (Sánchez *et al.*, 2004). Because nitrate-reductase (NR) and glutamine-synthetase (GS) play a major role in plant N assimilation, we chose to evaluate the impact of ammonium and nitrate fertilization on the development of young olive trees (cv. Cobrançosa) and its influence on the activity of these two enzymes (experiment A). In the study carried out with 'Cobrançosa' olive trees, 4 different N levels (N0 – 0 kg/ha, N1 – 30 kg/ha, N2 – 60 kg/ha and N3 - 90 kg/ha) and 3 $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ ratios (100:0 ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$), 50:50 (NH_4NO_3) and 0:100 ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) were tested.

In experiment B we evaluated potential nitrate and ammonium leaching from the root zone in the period from late autumn to early spring, after 2 levels of N, N0 and N3, and 2 N-sources, NH_4NO_3 and $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, were added to the soil.

The effects of the N-treatment showed no influence on plant growth, total N, NO_3^- and NH_4^+ status, nitrate-reductase or glutamine-synthetase activity. In these experimental conditions N-fertilization appears not to have influenced the studied parameters. NH_4NO_3 treatment used in experiment B proved to be not as vulnerable as $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ treatment to ammonium and nitrate losses.

One last consideration is related to the fact that under equal physiological circumstances, the decision of which N form to be used has to reason with the orchard management. The existence of an irrigating system, the possibility of fertilization with irrigation, the availability of different N forms and the use of other nutrients besides nitrogen, are some of the aspects that olive growers have to take into account.

ÍNDICE

	Página
Agradecimentos	i
RESUMO	ii
ABSTRACT	iii
EXTENDED ABSTRACT	iv
ÍNDICE	vi
ÍNDICE DE QUADROS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E UNIDADES	xii

	Página
1 - INTRODUÇÃO	1
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 - Considerações gerais	3
2.2 - Ciclo biológico da oliveira	4
2.3 - Dinâmica do azoto (N) no sistema solo-planta	5
2.3.1 - O N no solo	6
2.3.1.1 - Mineralização e imobilização do N	7
2.3.2 - Absorção do N pela planta	8
2.4 - Fertilização azotada na oliveira	13
2.5 - A análise foliar como meio de diagnóstico do estado de nutrição azotada da oliveira	16
2.6 - Técnicas de avaliação do azoto na planta	17
2.7 - Contaminação das águas lixiviadas com nitrato	19
3 - MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 - Instalação dos ensaios	21
3.1.1 - Protecção fitossanitária	22
3.2 - Caracterização do solo	22
3.3 - Condições climáticas	23
3.4 - Cultivar	24
3.5 - Caracterização dos ensaios	25

3.5.1 -	Avaliação da resposta de oliveiras jovens cv. Cobrançosa à adubação azotada (Ensaio A)	25
3.5.1.1 -	Delineamento experimental	25
3.5.1.2 -	Adubação azotada	25
3.5.1.3 -	Avaliação de parâmetros biométricos das oliveiras	26
3.5.1.3.1 -	Material vegetal	26
a -	Diâmetro do tronco.....	26
b -	Altura das árvores	27
c -	Comprimento dos lançamentos	27
3.5.1.4 -	Contagem do número de inflorescências e frutos	27
3.5.1.5 -	Determinação do teor de azoto nas folhas	27
a -	Colheita das amostras	27
b -	Preparação das amostras	27
c -	Métodos de determinação laboratorial	28
c.1 -	Teor de azoto total	28
c.2 -	Teor de azoto amoniacal e nítrico	28
c.3 -	Ensaio enzimáticos	28
c.3.1 -	nitrato-redutase (NR)	29
c.3.2 -	glutamina-sintetase (GS)	29
3.5.2 -	Avaliação da susceptibilidade à lixiviação pela água da chuva dos adubos azotados utilizados (Ensaio B)	30
3.5.2.1 -	Delineamento experimental	30
3.5.2.2 -	Amostragens e determinações	30
3.5.2.2.1 -	Material Vegetal	30
3.5.2.2.2 -	Colheita de amostras de lixiviados	31
a -	Recolha de amostras	31
b -	Teores de azoto amoniacal e nítrico	31
3.6 -	Métodos estatísticos	31
4 -	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1 -	Avaliação da resposta de oliveiras jovens cv. Cobrançosa à adubação azotada (Ensaio A)	32
4.1.1 -	Características biométricas das árvores	32

a –	Diâmetro do tronco	32
b –	Altura das árvores	32
c –	Comprimento dos lançamentos	32
4.1.2 -	Contagem de inflorescências e frutos	36
4.1.3 -	Teor de azoto nas folhas	36
4.1.3.1 -	Azoto total	36
4.1.3.2 -	Teores de NH_4^+ e NO_3^- livres	37
4.1.3.3 -	Determinação da actividade enzimática da nitrato-redutase (NR)	40
4.1.3.4 -	Determinação da actividade enzimática da glutamina-sintetase (GS)	41
4.2 -	Avaliação da susceptibilidade à lixiviação pela água da chuva dos adubos azotados utilizados (Ensaio B)	42
4.2.1 -	Características biométricas das árvores	42
4.2.2 -	Número de inflorescências e frutos	43
4.2.3 -	Teor de azoto nas folhas	44
4.2.3.1 -	Azoto Total	44
4.2.3.2 -	Teores de NH_4^+ e NO_3^- livres nas folhas	45
4.2.3.3 -	Avaliação da actividade enzimática da nitrato-redutase (NR)	46
4.2.3.4 -	Determinação da actividade da glutamina-sintetase (GS)	46
4.2.4 -	Teor de azoto amoniacal e nítrico na água lixiviada	47
5 -	CONCLUSÃO	51
6 -	BIBLIOGRAFIA	53

ÍNDICE DE QUADROS

	Página
Quadro 1 – Época de colheita do órgão ou parte da planta indicado para constituir uma amostragem para análises foliares e intervalos normais de azoto nas folhas de oliveira (Elaborado a partir LQARS, 2006; Fernández-Escobar, 2008; Mendes e Cavaco, 2010).....	17
Quadro 2 – Características físico-químicas do substrato Siro Oliva	21
Quadro 3 – Algumas características físicas e químicas do solo da Tapada da Ajuda	23
Quadro 4 – Níveis de azoto e proporções $\text{NO}_3^- : \text{NH}_4^+$ aplicados a cada planta em Setembro, Outubro e Novembro de 2009 a jovens oliveiras cv. Cobrançosa	26
Quadro 5 – Teores de azoto total nas folhas do terço médio dos lançamentos do ano colhidas durante o repouso Invernal (Janeiro e Fevereiro) nas diferentes doses e modalidades. Cada amostra resultou da mistura de 5 repetições	37
Quadro 6 – Valores dos teores foliares de ião amónio e ião nitrato livres nas jovens oliveiras sujeitas a diferentes doses (0, 30, 60, 90 kg/ha) e proporções de $\text{NO}_3^- : \text{NH}_4^+$ (100:0, 50:50, 0:100) colhidas em Janeiro e em Fevereiro de 2010. Letras iguais correspondem à inexistência de diferenças significativas para pares de médias (teste de Schéffé $P= 0,05$) (\square Idd significam valores inferiores a 0,01 mg de ião por kg de matéria seca).	38
Quadro 7 – Valores médios do teor de glutamyl-hidroxamato/proteína total nas folhas de oliveiras adubadas com diferentes doses (30, 60, 90 kg/ha) e proporções de $\text{NO}_3^- : \text{NH}_4^+$ (100:0, 50:50, 0:100)	

colhidas em Fevereiro. Média de 5 árvores por modalidade e dose - letras iguais correspondem à inexistência de diferenças significativas para pares de médias (teste de Schéffé $P= 0,05$)

42

Quadro 8 – Teores de azoto total nas folhas do terço médio dos lançamentos do ano colhidas durante o repouso Invernal (Janeiro e Fevereiro) nas diferentes doses e proporções de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ (100:0, 50:50, 0:100). Cada amostra resultou da mistura de 3 repetições.....

45

Quadro 9 - Valores dos teores foliares de ião amónio e ião nitrato livres nas jovens oliveiras sujeitas a diferentes doses (0, 90 kg/ha) e proporções de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ (100:0, 50:50) colhidas em Janeiro e em Fevereiro de 2010. Letras iguais correspondem à inexistência de diferenças significativas para pares de médias (teste de Schéffé $P= 0,05$) (□ Idd significam valores inferiores a 0,01 mg de ião por kg de matéria seca).....

46

Quadro 10 - Valores médios do teor de glutamil-hidroxamato/proteína total nas folhas de oliveiras adubadas com diferentes doses (0, 90 kg/ha) e proporções de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ (100:0, 50:50) colhidas em Fevereiro. Média de 5 árvores por modalidade e dose - letras iguais correspondem à inexistência de diferenças significativas para pares de médias (teste de Schéffé $P= 0,05$).....

46

Quadro 11 - Teores médios totais de N-NO_3^- e N-NH_4^+ em mg/vaso detectados nas águas lixiviadas das oliveiras sujeitas a diferentes tratamentos azotados ao longo de todo o ensaio.....

50

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1 – Modelo dos efeitos do fornecimento de azoto no crescimento das folhas e nos vários constituintes da planta (→ , fornecimento de N sub-ótimo a ótimo;► fornecimento de N elevado a excessivo) (Adaptado de Marschner, 1995)	12
Figura 2 – Modelo das vias de assimilação do amoníaco (1,2) Via glutamina-sintetase-glutamato-sintase, com baixo fornecimento de NH_3 (1) e com elevado fornecimento de NH_3 (2). (3) Via glutamato desidrogenase. (Adaptado de Marschner, 1995)	19
Figura 3 – Precipitação mensal acumulada (mm) e temperatura média mensal registadas na estação meteorológica do Departamento de Ciências do Ambiente, Secção de Agrometeorologia em Lisboa entre Abril de 2009 e Julho 2010	24
Figura 4 – Média e erro padrão dos acréscimos relativos ao comprimento dos 5 ramos marcados por árvore nas oliveiras testemunha.....	34
Figura 5 – Média e erro padrão dos acréscimos relativos ao comprimento dos 5 ramos marcados por árvore, nas oliveiras sujeitas à adubação azotada de 30 kg/ha.....	34
Figura 6 – Média e erro padrão dos acréscimos relativos ao comprimento dos 5 ramos marcados por árvore, nas oliveiras sujeitas à adubação azotada de 60 kg/ha.....	35
Figura 7 – Média e erro padrão dos acréscimos relativos ao comprimento dos 5 ramos marcados por árvore, nas oliveiras sujeitas à adubação azotada de 90 kg/ha.....	35

Figura 8 –	Média de N-NH_4^+ (mg kg^{-1}) foliar nas jovens oliveiras sujeitas a diferentes doses (0, 30, 60, 90 Kg/ha) colhidas em Janeiro e Fevereiro.....	39
Figura 9 –	Concentrações de azoto amoniacal (mg/L) na água lixiviada das oliveiras sujeitas a diferentes tratamentos azotados ao longo de todo o ensaio	48
Figura 10 –	Concentrações de azoto nítrico (mg/L) na água lixiviada das oliveiras sujeitas a diferentes tratamentos azotados ao longo de todo o ensaio	49

SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E UNIDADES

ANOVA	Análise de variância
β ME	β -mercaptoetanol
cv.	cultivar
DGADR	Direção Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural
<i>et al.</i>	e outros
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nation
INGA	Instituto Nacional de Intervenção e Garantia Agrícola
INE	Instituto Nacional de Estatística
LQARS	Laboratório Químico Agrícola Rebelo da Silva
MADRP	Ministério da Agricultura, Desenvolvimento Rural e Pescas
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido-fosfato
rpm	Rotações por minuto

1. INTRODUÇÃO

A oliveira (*Olea europaea*), pertencente à família botânica *Oleaceae*, é uma das plantas cultivadas mais antigas, havendo fortes indícios do seu cultivo se ter iniciado 4000 a 3000 anos antes de Cristo na região da Palestina. O seu principal produto, o azeite, representa 90% das 16 000 milhões de toneladas de azeitonas produzidas anualmente a nível mundial, enquanto apenas 10% da produção é utilizada para consumo de azeitona de mesa (Barranco *et al.*, 2008).

Portugal é o oitavo maior produtor de azeitona no Mundo, ocupando esta cultura o sétimo lugar nas culturas permanentes com maior expressão a nível nacional (FAO, 2007).

No nosso país tem-se verificado uma tendência crescente da produção ao longo da última década, mais propriamente um aumento de cerca de 17 850 ha de olival com um acréscimo de 91 766 toneladas de azeitona (INE, 1999; 2009). Uma área de produção na ordem dos 380 000 ha concentra-se no Alentejo, Trás-os-Montes e Beira Interior, sendo que a região do Alentejo apresenta aptidões olivícolas excepcionais, produzindo um total de 45% do azeite nacional.

O olival tradicional de sequeiro, de densidade média de plantação de 60 a 100 árvores por hectare, continua a ser o sistema mais utilizado em Portugal (INGA, 2004/05), factor que, aliado a solos de baixa fertilidade e a uma má gestão de técnicas culturais, entre as quais a fertilização, leva a baixas produções unitárias de azeitona e azeite (DGADR, 2010).

A fertilização, uma das práticas mais frequentes em agricultura, visa satisfazer as necessidades nutritivas das plantas quando os nutrientes não se apresentam em quantidades e/ou proporções adequadas no solo. Deve ter sempre por base os aspectos económicos da produção e o respeito pelo ambiente, permitindo melhorar ou manter o estado de fertilidade do solo (LQARS, 2006). No nosso país, fertilizações da oliveira, principalmente as azotadas, baseadas em recomendações suportadas por experimentação apropriada, são pouco frequentes, levando a menores eficiências, reduções de qualidade, gastos acrescidos e até mesmo problemas de natureza ambiental. Esta situação é comum com adubos azotados visto o azoto comportar-se no solo de maneira diferente dos outros nutrientes minerais, na forma nítrica (NO_3^-) é muito móvel, enquanto que em formas não assimiláveis está normalmente ligado à matéria orgânica (Marschner, 1995; Mengel e Kirkby, 2001).

Os dados experimentais que serão apresentados nesta dissertação resultaram de um ensaio de fertilização azotada nítrica e amoniacal da oliveira cv. Cobrançosa que teve lugar no Horto de Química Agrícola Boaventura de Azevedo do Instituto Superior de Agronomia.

Os principais objectivos que visámos atingir com o presente trabalho foram:

- Avaliar os efeitos da adubação azotada nítrica e amoniacal no desenvolvimento das jovens oliveiras;
- Avaliar os efeitos da adubação azotada nítrica e amoniacal na actividade das enzimas nitrato-redutase e glutamina-sintetase em oliveiras jovens;
- Avaliar as perdas de N por lixiviação dos sais azotados utilizados e consequentemente a sua maior ou menor propensão para serem prejudiciais para o ambiente.

Deste modo esperamos contribuir para a optimização das normas de fertilização azotada em oliveiras jovens.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Considerações gerais

Apesar de ser uma espécie que se concentra maioritariamente entre os 30º e os 45º de latitude, tanto no hemisfério Norte com no Sul (Barranco *et al.*, 2008), a oliveira detém uma grande facilidade de adaptação a variadas condições de solo e clima (Ferreira *et al.*, 1986).

Como espécie tipicamente mediterrânica, o cultivo da oliveira é favorecido por um Inverno chuvoso e um Verão quente e seco, sendo que nas principais regiões oleícolas do Mundo a temperatura média anual se encontra entre os 15ºC e os 20ºC. Apesar de existirem variedades mais ou menos resistentes a temperaturas baixas, abaixo dos -5º C já se manifestam danos e abaixo dos -8º C estes são considerados graves. Não obstante este princípio, a oliveira necessita de um certo número de horas de frio para o seu abrolhamento vegetativo e floração (Agusti, 2004).

Como espécie xerofítica, a oliveira pode ser cultivada em regiões com pluviosidades inferiores a 200 mm/ano. Contudo, os óptimos de produção só se atingem face a precipitações superiores a 500 mm/ano (Milheiro, 1992b). A água constitui o factor mais limitativo na produção desta cultura, uma vez que a distribuição anual pluviométrica é sazonal. Na época outonal e invernal, como consequência das baixas temperaturas, assiste-se a uma redução significativa da actividade vegetativa e, neste período, a pluviometria é normalmente superior ao consumo de água por parte da cultura, representando 70% em média da pluviometria total anual. Desta forma, a água em excesso é acumulada no solo e durante uma grande parte da Primavera e Verão satisfaz as necessidades hídricas da cultura. É visível a importância que o solo desempenha na optimização do aproveitamento das águas da chuva (Barranco *et al.*, 2008), aliado a potenciais aplicações de água onde as carências deste elemento se justifiquem (Milheiro, 1992b).

Gonzáles e Trancoso (1972) conceberam um modelo de solo óptimo para as condições climáticas presentes na província de Sevilha em Espanha com uma pluviosidade média anual de 600 mm. Para tal, basearam-se nos seus estudos em olivais produtores de azeitona de conserva da zona e concluíram que este solo é, juntamente com outras características, de estrutura grumosa ou granulosa, textura franco-argilosa a franco-arenosa e com pH compreendido entre 7 e 8. As características físicas e o pH de muitos dos solos das nossas maiores áreas produtivas como no distrito de Santarém, Portalegre, Évora e Beja, ajustam-se ou aproximam-se ao referido modelo (Milheiro, 1992b).

Ainda no âmbito da adaptação ecológica, esta é uma planta resistente à secura e sensível à asfixia radicular. Em solos pouco permeáveis, com elevada capacidade de retenção de água e pouco profundos, há uma maior probabilidade de se assistir a um encharcamento prolongado e a consequentes condições anaeróbias do meio, condições às quais a oliveira é particularmente susceptível (Agusti, 2004). É também moderadamente tolerante à salinidade, sendo o limite de tolerância de cerca de 4 dS m⁻¹, chegando mesmo aos 6 dS m⁻¹ em variedades bem adaptadas (Mateos, 1996 citado por Tombesi *et al.*, 1996). Apresenta sensibilidade a situações de carência de boro (LQARS, 2006), mas em contrapartida é mais tolerante a um excesso deste elemento na solução do solo relativamente a outras fruteiras (Barranco *et al.*, 2008).

2.2. Ciclo biológico da oliveira

Apesar do crescimento dos gomos na oliveira ocorrer ao longo de um ano, os processos que conduzem à frutificação requerem dois anos consecutivos, considerando-se que esta espécie detém um ciclo reprodutivo bienal.

Normalmente as inflorescências diferenciam-se em gomos que se desenvolveram nas axilas de folhas de ramos do ano anterior, levando a que gomos de 3 a 11 meses de idade possam originar flores. A quantidade de gomos que se diferencia num ano pode variar entre os 0 e os 95% dos gomos da vegetação do ano anterior, sendo que o grau de diferenciação destes é controlado por factores endógenos e exógenos (Lavee, 1996).

Em regiões relativamente quentes, o nível de diferenciação e de desenvolvimento floral é maior depois de Invernos mais frios. Esta situação levou a que Lavee (1996) sugerisse que a necessidade de frio não estaria relacionada com a diferenciação mas sim com a abertura dos gomos florais. Rallo e Martin (1991) defendem mesmo que a indução inicial ocorre no Verão, constituindo um primeiro e determinante estímulo para a determinação da diferenciação floral potencial dos gomos na oliveira. Esta indução estival depende principalmente do metabolismo endógeno da árvore, levando a que o gomo tenha que atingir um grau de maturação específico antes de estar receptivo às condições de indução da floração no Inverno.

A simultaneidade do crescimento vegetativo e do desenvolvimento reprodutivo, que caracteriza a oliveira, origina fenómenos de competição para os nutrientes e fotoassimilados entre os diferentes órgãos da planta. Esta situação implica que em anos de grande produção o crescimento dos raminhos seja escasso, limitando o número de entre-nós e potenciais gomos de floração relativamente a anos de baixa produção (Barranco *et al.*, 2008).

Já a quantidade de frio e sua sequência constituem os factores ambientais/exógenos que assumem o papel de segundo estímulo no Inverno nos processos de iniciação e diferenciação sexual (Lavee, 1996).

A floração tem lugar entre os meses de Maio e Junho, quase exclusivamente em raminhos que se desenvolveram no ano anterior. Uma vez realizada a polinização, segue-se o vingamento do fruto (García, 2005). Geralmente produz-se um elevado número de inflorescências e de flores, mas destas apenas 1 a 3% se transformam em fruto (Lavee, 1996).

O crescimento da azeitona em termos quantitativos assemelha-se a qualquer outra drupa, ajustando-se à curva dupla sigmóide (Rallo e Cuevas, 2008). Uma vez realizada a fecundação, é uma questão de dias até se dar a primeira fase de crescimento rápido do fruto, reflectindo-se principalmente no aumento do endocarpo. Segue-se uma fase de crescimento lento, na qual o embrião e o endocarpo atingem o seu tamanho final. No fim deste período, mais propriamente em finais de Julho, as células do mesocarpo alargam levando a um crescimento rápido dos frutos. Os processos de biossíntese e acumulação de azeite também decorrem nesta fase, findando no Outono com o iniciar de processos de maturação, manifestados na mudança de cor do fruto (Lavee, 1996; Beltrán *et al.*, 2008; Rallo e Cuevas, 2008).

2.3. Dinâmica do azoto (N) no sistema solo-planta

Na biosfera o azoto apresenta-se em diferentes formas, que incluem o azoto molecular (N_2), óxidos de azoto (NO_x), amoníaco (NH_3), azoto mineral (NO_3^- , NH_4^+ , NO_2^-) e o N orgânico. Apesar da enorme reserva de azoto molecular, a planta não o consegue utilizar directamente, sendo necessários microrganismos procarióticos capazes de fixar o azoto atmosférico, transformando-o em ião amónio (NH_4^+) e consequentemente disponibilizando-o para as plantas e outros organismos do solo.

No solo e na água, o azoto apresenta-se sobretudo em formas orgânicas que, na maioria dos casos, só depois de sofrerem mineralização é que são disponibilizadas às plantas, e sob as formas inorgânicas (Santos, 1995; Varennes, 2003).

Dentro dos elementos essenciais à planta, o N é aquele consumido em maiores quantidades, visto ser um constituinte essencial de numerosas estruturas orgânicas indispensáveis ao metabolismo e divisão celular, como aminoácidos, proteínas, clorofilas e hormonas vegetais (Traore e Maranville, 1999; Ruiz *et al.*, 2000). O azoto desempenha um papel vital no desenvolvimento vegetativo e reprodutivo das plantas (Fernández-Escobar, 2008; Li *et al.*, 2008; Fernández-Escobar *et al.*, 2009).

2.3.1. O N no solo

Do azoto existente nos solos, 95% encontra-se na forma de N orgânico, só estando disponível para as plantas após mineralização. A fracção mineral encontra-se, presente na solução do solo, adsorvida nas superfícies coloidais e “fixada” nas malhas dos minerais argilosos, constituindo apenas cerca de 5% do azoto total do solo (Neeteson e Carton, 2001). Um solo mineral contém nas camadas superficiais um teor de azoto entre os 0,2 e os 5 g kg⁻¹ solo, sendo o intervalo de 1-2 g kg⁻¹ solo o mais representativo nos solos cultivados (Carranca, 2000; Varennes, 2003).

A circulação do N no ecossistema envolve uma série de reacções que vão desde a síntese/decomposição do material orgânico e conversão a formas minerais, até às reacções na atmosfera e no meio aquático. No solo, as formas inorgânicas de N provêm, fundamentalmente, da matéria orgânica do solo, do N atmosférico (N₂), do N dissolvido na água da chuva ou dos fertilizantes minerais azotados.

Para que o azoto presente na forma orgânica possa ser utilizado pelas plantas, é necessária a sua conversão em formas assimiláveis, através da mineralização da matéria orgânica. Numa primeira fase, assiste-se à formação de amoníaco por acção de microrganismos heterotróficos do solo (amonificação), que utilizam a energia libertada na reacção. Ao reagir com a água, o amoníaco protoliza-se originando o ião amónio (NH₄⁺), o qual pode ter vários destinos, tais como ser absorvido pelas plantas, convertido a nitrato (NO₃⁻), ser adsorvido à superfície das partículas de argila ou volatilizar-se sob a forma de NH₃ (Marschner, 1995; Mengel e Kirkby, 2001).

Ao processo de oxidação biológica do amoníaco a nitrato dá-se o nome de nitrificação, levado a cabo por bactérias autotróficas, isto é, bactérias que obtêm energia através da oxidação de sais inorgânicos e utilizam o dióxido de carbono (CO₂) como fonte de C. A oxidação do NH₄⁺ a NO₃⁻ é relativamente rápida em condições normais, resultando numa conversão contínua de azoto orgânico a nítrico, com pequena ou nenhuma acumulação de ião amónio (Halfacre e Barden, 1979; Marschner, 1995; Mengel e Kirkby, 2001).

Apesar do ião amónio poder ser adsorvido nas superfícies coloidais passando a fazer parte do complexo de troca do solo, o ião nitrato não é retido pelas partículas de carga negativa e permanece na solução do solo. Esta situação aliada ao facto do NO₃⁻ ser muito móvel, faz com que esta forma mineral seja muito susceptível à lixiviação e ao escoamento superficial (Carranca, 2000; Costa *et al.*, 2002; Sánchez Pérez *et al.*, 2003). Em condições de anaerobiose, o nitrato ainda pode ser reduzido por desnitrificação a formas gasosas como o óxido nitroso (N₂O), o óxido nítrico (NO) e o azoto elementar (N₂), que se libertam para a atmosfera. Os microrganismos

desnitrificantes recorrem ao NO_3^- ou ao NO_2^- como fonte de oxigénio em vez do oxigénio molecular (O_2) (Marschner, 1995). Segundo Halfacre e Barden (1979) estas perdas podem constituir cerca de 10 % do azoto adicionado ao solo anualmente.

Na maioria dos solos agrícolas, onde ocorrem condições favoráveis à nitrificação (disponibilidade de NH_4^+ e de oxigénio), o NO_3^- é a forma predominante de N (Liu *et al.*, 2008). Por outro lado, as condições de alagamento presentes em arrozais (Li *et al.*, 2008) ou até mesmo as baixas temperaturas, elevados teores de matéria orgânica, menor pH e arejamento deficiente, comuns em florestas de coníferas e algumas pradarias, levam a que a formação de NO_3^- seja inibida. Nestes casos o NH_4^+ constitui a principal forma de N disponível para as plantas (Martins-Loução e Cruz, 1999).

2.3.1.1. Mineralização e imobilização do N

A mineralização do azoto representa a produção de N inorgânico a partir de N orgânico. A matéria orgânica (MO) do solo engloba uma grande variedade de substâncias, incluindo seres vivos, tecidos mortos vegetais e animais e húmus, este último uma mistura de material orgânico já decomposto e modificado ou sintetizado de novo. É na MO que se encontra armazenado o azoto que depois será convertido a formas de N inorgânico através da mineralização. Este processo permite a absorção do N inorgânico por parte das plantas e a sua sucessiva incorporação em moléculas orgânicas.

A mineralização é levada a cabo por vários fungos, bactérias, actinomicetas e protozoários heterotróficos, começando pela hidrólise de grandes moléculas em monómeros que levam à formação de NH_4^+ (Mengel e Kirkby, 2001; Neeteson e Carton, 2001). A facilidade com que o azoto orgânico é mineralizado também influencia a disponibilidade deste nutriente, sendo que das várias formas de N orgânico nos solos a forma aminada (presente em aminoácidos, péptidos e açúcares aminados) constitui a fonte mais importante para a mineralização (Mengel e Kirkby, 2001). A concentração de NH_4^+ no solo está dependente de factores como o tipo de solo, o clima e as práticas culturais exercidas (Carranca, 2000). Solos pobres em colóides, secos e/ou de pH elevado, favorecem perdas de amoníaco por volatilização, assim como temperaturas e velocidades de vento elevadas. A quantidade e o tipo de argila presente no solo, embora numa escala mais pequena, também têm implicações directas na mineralização do N, levando à adsorção e fixação do N orgânico. As cavidades existentes nas folhas tetraédricas dos minerais argilosos do tipo 2:1, como

as ilites, as vermiculites e as montmorilonites, podem fixar fortemente o NH_4^+ , protegendo-o da decomposição microbiana (Mengel e Kirkby, 2001).

Os organismos do solo heterotróficos são os mais numerosos e como dependem da oxidação de compostos orgânicos para obterem o carbono e a energia de que necessitam, levam à decomposição da MO. O crescimento destes decompositores de MO, assim como o de todos os outros organismos presentes no solo, também está dependente da disponibilidade do fósforo e do potássio nas proporções de C:N:K:P de aproximadamente de 100:10:1:1 (Varenes, 2003). Se a concentração destes nutrientes for abaixo do óptimo, pode verificar-se uma imobilização de nutrientes; ocorre uma redução da taxa de crescimento da biomassa microbiana e paralelamente um consumo dos nutrientes disponíveis na solução do solo, em especial do N. Se, por outro lado, os nutrientes presentes nos resíduos estiverem em excesso, é potenciada a mineralização e os nutrientes vão sendo libertados à medida que a decomposição decorre (Schepers, 2008).

Os processos de mineralização e imobilização do N ocorrem simultaneamente no solo. A taxa de mineralização líquida de um nutriente permite a compreensão do balanço entre estes dois processos, estando dependente de condições ambientais e da qualidade dos resíduos adicionados ao solo.

Quando um resíduo orgânico é adicionado ao solo, a população microbiana aumenta rapidamente e tornam-se activos os microrganismos que anteriormente se encontravam em formas de resistência. Nesta fase inicial da decomposição, a procura de N pelos microrganismos aumenta e ocorre uma imobilização deste nutriente. Os açúcares e o amido são degradados primeiro e uma vez esgotados os materiais mais facilmente decomponíveis, começam-se a usar outros compostos. Ocorre uma grande libertação de energia e dióxido de carbono como resultado da oxidação de compostos orgânicos (mineralização). No entanto, no caso específico do N, quando em excesso os microrganismos utilizam-no como fonte de energia numa reacção de amonificação formando-se ião amónio (Varenes, 2003).

2.3.2. Absorção do N pela planta

Como espécie perene, a oliveira detém órgãos de reserva de nutrientes que reutiliza com facilidade, o que contribui para que tenha menores necessidades nutritivas relativamente a espécies anuais. Segundo Klein e Weinbaum (1984), citados no trabalho de Fernández-Escóbar (2008), as folhas constituem na oliveira um importante local de armazenamento de N, assim como as raízes, a casca do tronco e

os ramos. Este azoto será, posteriormente, mobilizado durante o crescimento inicial na Primavera.

A oliveira detém a capacidade de reutilizar os seus elementos nutritivos, motivo pelo qual as folhas envelhecidas mudam para a cor amarela logo antes de caírem, aumentando as reservas da árvore (Fernández-Escobar, 2008). Não obstante, o azoto assume o papel de maior componente nutritivo das plantas na ausência de limitações hídricas, constituindo o elemento mineral mais frequentemente aplicado ao olival. (Marcelo *et al.*, 2005; Fernández-Escobar, 2008; Fernández-Escobar *et al.*, 2009). A oliveira responde (mais rapidamente e com maior rendibilidade) a este nutriente, acelerando e aumentando, de um modo geral, o crescimento de lançamentos e o número de frutos vingados por árvore. O azoto também é responsável pelo aumento da quantidade de clorofila e da capacidade de assimilação de outros nutrientes (López-Villalta, 1996).

A maior parte de N entra na planta através das raízes, embora também possa fazê-lo pela parte aérea, através dos estomas e microporos das folhas. Um sistema radicular vasto permite uma eficaz absorção de água e de nutrientes por parte da planta, aumentando o volume de solo explorado e conseqüentemente a capacidade da raiz entrar em contacto com formas de N do solo (Varennnes, 2003). Touraine (2004) estudou a absorção de NO_3^- observando que a raiz possui esta capacidade em toda a sua superfície, desde o ápice até à base, com um pico numa região sub-apical.

As formas inorgânicas de N (NO_3^- e NH_4^+) são aquelas preferencialmente absorvidas pelas plantas (Marschner, 1995; Bouranis *et al.*, 2004; Nicodemus *et al.*, 2008), excepto em casos de simbiose com microrganismos capazes de fixar o azoto atmosférico.

A forma de N presente no solo pode ter efeitos muito notórios nas características fisiológicas e morfológicas das plantas (Therios e Sakellariadis, 1988; Truax *et al.*, 1994). A quantidade e proporção de N-inorgânico absorvido pela planta dependem, entre outros factores, da espécie (Min *et al.*, 1998; Nicodemus *et al.*, 2008), da idade, da temperatura e da intensidade luminosa (Mengel e Kirkby, 2001; Tabatabaei *et al.*, 2008). O NH_4^+ absorvido é rapidamente assimilado em aminoácidos e proteínas para armazenamento nas raízes, isto porque pequenos níveis deste catião podem causar toxicidade à planta, assim como a acidificação da rizosfera (Bouranis *et al.*, 2004; Cruz *et al.*, 2006; Babourina *et al.*, 2007; Ruan *et al.*, 2007 citado em Hessini *et al.*, 2009; Nicodemus *et al.*, 2008). Contrariamente ao ião amónio, o NO_3^- absorvido pelas plantas pode ser logo armazenado nos vacúolos (Hessini *et al.*, 2009), assimilado em formas orgânicas para futuro armazenamento nas raízes ou translocado no xilema com aminoácidos para a parte aérea da planta, onde será

reduzido (Nicodemus *et al.*, 2008) (Figura 1). A absorção do nitrato através da membrana plasmática processa-se por transporte activo, dois prótons são co-transportados para o interior da célula por cada molécula de NO_3^- absorvida, e é regulada, estando adaptada às necessidades da planta. Lee e Rudge (1986) e Cooper e Clarkson (1989), mencionados em Miller *et al.* (2007), salientam que o estado nutritivo azotado participa na regulação dos processos de absorção e assimilação de N. Como o NO_3^- é assimilado por conversão a nitrito, a NH_4^+ e posteriormente a aminoácidos, estes autores sugerem que metabolitos azotados como os aminoácidos, actuam como sensores do estatuto de N, produzindo um sinal que regula toda a entrada deste elemento na planta. Embora muitas moléculas e iões contendo N possam actuar como sinalizadores do estatuto azotado, o NO_3^- foi proposto como um metabolito sinalizador. O ião nitrato também estimula a translocação de hormonas como a citocinina, entre a raiz e os lançamentos (Miller e Hawkins, 2007), onde a expansão foliar será induzida. Deste modo o transporte das citocininas desde a raiz até às folhas, conjugado com o metabolismo de N, funcionam como indicadores da disponibilidade de azoto na rizosfera (Takei *et al.*, 2002).

Como anteriormente mencionado, o nitrato não é directamente incorporado em compostos orgânicos. O primeiro passo da assimilação deste ião consiste na redução do NO_3^- a NH_4^+ , que se realiza em duas etapas: redução do nitrato a nitrito pela enzima nitrato-redutase (NR); redução do nitrito pela nitrito-redutase (NiR) (Oliveira *et al.*, 2001 citado em Cruz *et al.*, 2004). A NR localiza-se no citoplasma de células de órgãos vegetativos (Crawford, 1995; Berezi e Moller em 2000, citados em Poonnachit e Darnell, 2004) e, apesar de geralmente se encontrar tanto na raiz como na parte aérea, o local onde se dá a redução do nitrato apresenta uma grande variabilidade entre espécies (Glass *et al.*, 2002; Poonnachit e Darnell, 2004; Nicodemus *et al.*, 2008). O controlo da expressão genética desta enzima permite que a redução do anião esteja coordenada com as necessidades em compostos de azoto reduzido dos órgãos da planta em crescimento (Miller e Hawkins, 2007), com a disponibilidade de NO_3^- (Miller *et al.*, 2007), com as condições ambientais (Mengel e Kirkby, 2001) e com a concentração de compostos de carbono reduzido (Bouranis *et al.*, 2004). As plantas asseguram a assimilação do azoto na forma nítrica incorporando o ião amónio em aminoácidos (Cruz *et al.*, 2004) e estes asseguram a transferência de azoto entre órgãos da planta. O ião amónio livre libertado em reacções de biossíntese e da fotorrespiração também é reassimilado. A redução de ião nitrato a ião amónio pode realizar-se tanto nas raízes, como nas folhas, variando consoante o fornecimento exterior do anião, a presença de outros nutrientes, a temperatura e a idade da planta. Embora a maioria de ião amónio seja absorvido pelas raízes das plantas, a forma

gasosa do amoníaco permite-o aceder à parte aérea através dos estomas, sendo rapidamente metabolizado nas células vizinhas (Varennnes, 2003). A glutamina-sintetase (GS) catalisa tanto nas folhas como nas raízes a assimilação do NH_4^+ em glutamina com consumo de ATP, utilizando o glutamato como substrato. Esta enzima, GS, funciona em ciclo com a glutamina-2 oxoglutarato aminotransferase, glutamato-sintase (GOGAT), constituindo o ciclo GS/GOGAT, a principal via de assimilação de amoníaco nas plantas (Mifflin e Habash, 2002). Na figura 2 do ponto 2.6 encontra-se esquematizado todo este processo.

O ião amónio só é assimilado quando há um nível adequado de poder redutor e esqueletos carbonados suficientes para a sua incorporação em compostos orgânicos (Mengel e Kirkby (1987) citados em Tabatabaei *et al.*, 2008). O fornecimento de esqueletos carbonados está primeiramente dependente da fotossíntese, enquanto o fornecimento de aminoácidos depende da concentração e formulação do azoto na zona da raiz (Tabatabaei *et al.*, 2008). A redução do NO_3^- nas raízes pode levar a um aumento de respiração neste órgão, uma vez que é necessária mais energia para assimilar o anião (Zogg *et al.* (1996) citados em Nicodemus *et al.*, 2008). Por outro lado, quando esta redução e futura assimilação em aminoácidos ocorre nas folhas, a energia e o poder redutor (NAD(P)H e ATP) fornecidos directamente da fotossíntese, representam uma diminuição no custo energético para as plantas (Schrader, 1984 citado em Nicodemus *et al.*, 2008; Debouba *et al.*, 2006). Uma elevada intensidade luminosa permite que a redução do ião nitrato não implique custos muito elevados para as plantas. No entanto, quando a intensidade luminosa é reduzida, assiste-se à competição entre a redução do anião e a redução do dióxido de carbono (Varennnes, 2003). De um modo geral, a absorção de NO_3^- é favorecida pelo maior estado energético das plantas e aumenta durante o período diurno quando há fotossíntese. Embora a absorção de NH_4^+ não seja tão influenciada pelo estado energético, a assimilação deste ião também requer a presença de esqueletos carbonados e de energia (ATP e NADPH) (Mengel e Kirkby, 2001). A absorção de N é, deste modo, regulada pelo fluxo de carbono que chega às raízes, proveniente dos fotoassimilados produzidos na parte aérea (processo relacionado com factores ambientais como a intensidade luminosa), pela situação nutricional da planta e concentração de N na rizosfera (Miller e Hawkins, 2007).

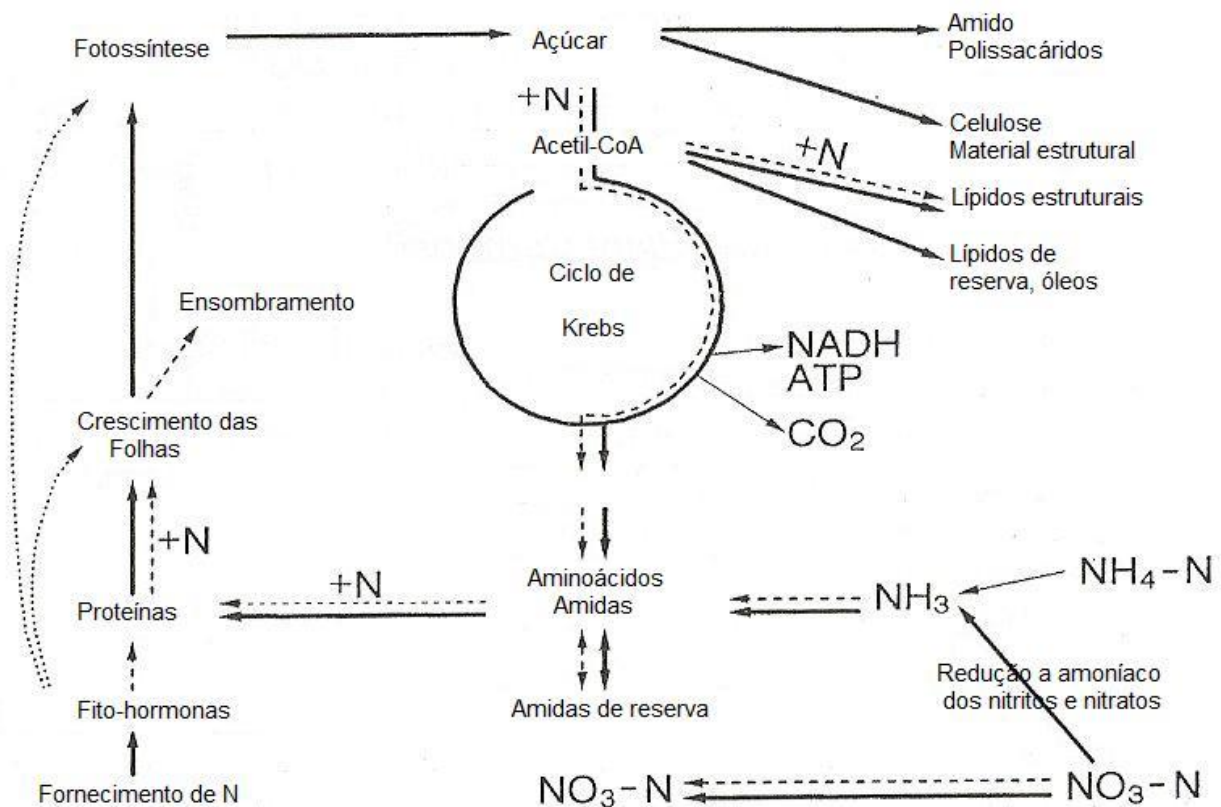


Figura 1 – Modelo dos efeitos do fornecimento de azoto no crescimento das folhas e nos vários constituintes da planta (→, fornecimento de N sub-óptimo a ótimo;.....> fornecimento de N elevado a excessivo) (Adaptado de Marschner, 1995)

A forma de azoto preferencialmente absorvida depende de espécie para espécie (Edwards e Horten, 1982 citados em Tabatabaei *et al*, 2008; Nicodemus *et al*, 2008; Warren, 2009). Lipson e Näsholm (2001), referidos em Warren (2009), constataram que a forma e dose de N, assim como a proporção de NH_4^+ : NO_3^- , mais favorável ao desenvolvimento das plantas, continua a ser objecto de estudo e controvérsia nos dias de hoje.

No caso de ser fornecida apenas uma das formas azotadas, o N-NO_3^- é normalmente mais eficiente no promover do crescimento dos órgãos vegetais do que o N-NH_4^+ (Abd-Elmonien *et al.*, 1996). No entanto, a disponibilização de azoto apenas na forma nítrica em quantidades acima da capacidade de assimilação das plantas, pode levar à acumulação de nitratos nos tecidos vegetais (Abd-Elmonien *et al.*, 1996; Hessini *et al.*, 2009). Os nitratos acumulados são dificilmente utilizados nos processos de crescimento pois, além da sua difícil libertação dos locais de armazenamento (vacúolos) para o citoplasma, onde serão reduzidos, também possuem uma baixa mobilidade no floema, não podendo ser facilmente translocados para outros locais

(Marschner, 1995). O ião nitrato induz a síntese da enzima nitrato-redutase, regula o fluxo de carbono fotossintético nas folhas (Bouranis *et al.*, 2004), o que faz com que seja capaz de regular o crescimento da planta, inclusive dos lançamentos e a razão lançamentos: raízes (Miller *et al.*, 2007). O fornecimento de aminoácidos, mais especificamente da glutamina, e de NH_4^+ (Kronzucker *et al.*, 1999) às raízes (Miller e Hawkins, 2007), inibe a absorção de NO_3^- . A relação negativa entre a translocação floémica de aminoácidos, dos lançamentos para a raiz, e a taxa de absorção de NO_3^- (Lee e Rudge, 1986, Cooper e Clarkson, 1989 citados em Miller *et al.*, 2007), levam a crer que os aminoácidos também actuam como sensores do estado nutritivo azotado das plantas.

2.4. Fertilização azotada na oliveira

Como maior componente nutritivo das plantas, e como tal com maior impacto no seu crescimento, o azoto é o nutriente mais frequentemente aplicado ao olival (Fernández-Escobar, 2009). Os efeitos deste elemento, e a sua disponibilidade para a planta, são afectados pelo nível de fertilidade e humidade do solo, pelo teor de N disponível no solo, assim como pela história de cultivo da zona (Montemurro, 2006).

Um ensaio levado a cabo por Civantos (2008) na Bacia Mediterrânea, citado por Fernández-Escobar *et al.* (2009), refere a presença deste elemento mineral na maioria das fertilizações aplicadas a oliveiras existentes nesta zona. Situação comum mesmo quando o potássio era o nutriente que mais provocava distúrbios nutricionais (Fernández-Escobar, 2008).

As remoções de N por colheita são baixas (aproximadamente 3-4 g N/kg azeitona), quando comparadas com as observadas em culturas anuais. Estas remoções conjugadas com aquelas resultantes da poda anual, 8-10 kg N/ha, costumam ser compensadas pela contribuição da água da chuva e pela mineralização da matéria orgânica (García-Novelo, 2006 citado em Fernández-Escobar, 2008). No entanto, Fernández-Escobar *et al.* (2009), citando um seu trabalho de 1994, concluíram que em Espanha fertilizantes azotados são aplicados anualmente em doses que variam desde os 9 aos 350 kg N ha⁻¹, não havendo na maioria das situações uma relação entre a quantidade de N aplicado e a produtividade dos oliveiros. O N remanescente no solo no Outono, no final do período vegetativo da oliveira foi estimado por Giménez *et al.* (2001) em 160 kg N ha⁻¹ em algumas áreas de Andalusia, valores provavelmente suficientes para corrigir qualquer deficiência em azoto na oliveira. Estas situações levam a crer que, em solos relativamente férteis, as necessidades de azoto por parte da planta são escassas. Jordão *et al.* (2004) não

obtiveram resposta à aplicação de azoto nos seus ensaios, o que poderá ser explicado pela existência de outras fontes deste elemento, nomeadamente o resultante da decomposição da matéria orgânica do solo (suficientes para suprir as necessidades dos olivais). Contudo, até há bem pouco tempo, eram privilegiadas as fertilizações de manutenção de N, justificáveis pela elevada mobilidade deste elemento no solo, pela sua susceptibilidade à volatilização e por ser escasso na maioria dos solos (Fernández-Escobar, 2008).

Hartmann (1958) observou que oliveiras plantadas em solos de baixa fertilidade na Califórnia obtiveram respostas positivas à aplicação de azoto, demonstrando um aumento do teor foliar de azoto, assim como um aumento de produção. Já em solos mais férteis o mesmo não se sucedeu, não tendo as oliveiras reagido às aplicações de azoto. García-Novelo *et al.* (2002), citados em Fernández-Escobar (2008), chegaram a resultados semelhantes, não encontrando resposta face à aplicação de azoto em oliveiras cuja concentração deste elemento nas folhas se encontrava acima do nível de deficiência. Segundo Chapman (1966), Childers (1966) e Beutel *et al.* (1983), mencionados em Fernández-Escobar (2008), o nível de deficiência de azoto nas folhas de oliveira recolhidas em Julho, reportado à matéria seca, é de 1,4%. No estudo de Ferreira *et al.* (1986) em olivais de sequeiro localizados em algumas zonas de Espanha, apenas as oliveiras com produtividades inferiores aos 35 kg/árvore revelaram um comportamento positivo após a aplicação de N (Lavee, 1996; Fernández-Escobar *et al.*, 2009). Todos estes resultados experimentais evidenciam a necessidade de critérios que permitam analisar o estado nutricional do olival e como tal, induzir uma utilização responsável de fertilizantes azotados (Montemurro *et al.*, 2006; Fernández-Escobar *et al.*, 2009).

A dificuldade em estabelecer uma estratégia de fertilização de uma cultura, em quantidade, época e forma de aplicação advém do facto das características da cultura, assim como as condições edafo-climáticas, influenciarem todo o processo. As necessidades nutritivas ao longo do ciclo produtivo são diferentes para todas as espécies, sendo que as condições ambientais (clima e solo) e as técnicas de cultivo aplicadas (rega, manutenção do solo) também condicionam o estado nutritivo das plantas, afectando a concentração dos elementos no solo e a sua disponibilidade. Para espécies perenes, outros factores também pesam na escolha de um plano de fertilização como a idade da plantação, a existência de órgãos de reserva e a alternância de safras (García e Quílez, 2003).

A forma como o azoto é fornecido ao terreno, a época de aplicação do adubo e o seu fraccionamento são aspectos que também influenciam a resposta final da oliveira (Milheiro, 1992a). A grande mobilidade das formas de N no solo, em condições

normais, pode provocar problemas de poluição nas águas superficiais e subterrâneas (Costa *et al.*, 2002; Sánchez Pérez *et al.*, 2003; Stefanelli, 2010) e problemas de salinização secundária quando o azoto é aplicado em grandes quantidades. Uma das medidas de prevenção face a estes problemas consiste no fraccionamento da adubação azotada, sendo que o ideal seria a aplicação sincronizada com as necessidades da cultura ao longo do seu ciclo vegetativo. Nem sempre é possível aplicar esta técnica, mas de um modo geral, parte do adubo é aplicado em adubação de fundo, garantindo o N necessário às plantas nas primeiras fases do ciclo vegetativo, e a outra parte em adubação de cobertura (Milheiro, 1992a).

Nas normas sobre fertilização azotada em olivais produzidos em regime de Produção Integrada (DGADR, 2010) estão definidos os teores foliares óptimos de nutrientes em árvores em produção, bem como as recomendações de fertilização azotada para esta cultura em função da análise foliar, do solo e da produção esperada (LQARS, 2006; DGADR, 2010).

As recomendações de fertilização azotada são efectuadas com base na idade das árvores, admitindo a aplicação de doses moderadas e crescentes de N em olivais do primeiro ao quarto ano de plantação (quantidades máximas de 15 kg N/ha no primeiro ano de plantação, 30 kg N/ha no segundo ano, 45 kg N/ha no terceiro e 60 kg N/ha no quarto ano, até à entrada em produção efectiva), em função do tipo de solo e da forma de aplicação do adubo (directamente ao solo ou na água de rega). Em olivais super intensivos de densidades superiores a 1000 árvores por hectare, onde já é comum a partir do terceiro ano verificarem-se produções elevadas, as quantidades de azoto podem ser reforçadas no segundo e terceiro anos após a plantação, podendo-se aplicar até 40 a 70 kg N/ha, respectivamente.

Em fertirrega, DGADR (2010) recomendam uma redução da quantidade de fertilizante azotado indicada para cada situação, na ordem dos 25% a 50%, uma vez que nestas condições se assiste a um aumento da eficiência da absorção de N do fertilizante.

A melhor época para se aplicar o azoto encontra-se entre a Primavera e o Verão, na altura das regas, desejáveis nos cinco primeiros anos (DGADR, 2010). De acordo com as normas de Produção Integrada (DGADR, 2010), a aplicação de N em olivais fertirregados deverá ser fraccionada, sendo que três quartos da dose recomendada devem ser aplicados desde o início da rega até o endurecimento do caroço (meados de Julho) e a restante quantidade distribuída até ao final do período de rega.

2.5. A análise foliar como meio de diagnóstico do estado de nutrição azotada da oliveira

A análise foliar é uma técnica de diagnóstico do estado de nutrição das culturas (Rubio-Covarrubias *et al.*, 2009) que já desde há muito assume um papel importante no estabelecimento e gestão de programas de fertilização.

Segundo Bould (1966), mencionado no trabalho de Fernández-Escobar (2008), este método baseia-se nos seguintes princípios: é na folha que ocorrem os principais fenómenos metabólicos; as variações no fornecimento de nutrientes reflectem-se na composição deste órgão; estas variações são mais evidentes em determinadas fases do desenvolvimento; as concentrações dos nutrientes na folha em períodos específicos do crescimento da planta são concordantes com o comportamento da cultivar, em termos de produção.

Assim como noutras fruteiras, a composição mineral das folhas da oliveira é influenciada por vários factores: o estado de desenvolvimento da árvore e da folha, as condições climáticas, a disponibilidade de nutrientes no solo, a distribuição e actividade das raízes, os níveis de produção e o estado de humidade do solo (Fernández-Escobar, 2008). Deste modo, foi evidente a necessidade de seleccionar o tipo de folha e a fase de desenvolvimento fisiológico que melhor reflectissem o estado de nutrição da oliveira. As folhas colhidas para análise devem cumprir certos requisitos, uma vez que se forem demasiado jovens a sua composição é variável, e se demasiado velhas, exportam nutrientes. A proximidade aos frutos também leva a que sofram mais facilmente exportações. Logo a amostragem tem que ser feita em alturas em que a concentração dos elementos na folha seja estável. No caso do azoto no olival, os períodos indicados são o mês de Julho e durante o repouso invernal, os meses de Dezembro e Janeiro (LQARS, 2006; Fernández-Escobar, 2008; DGADR, 2010). Uma vez colhidas segundo as condições referidas no Quadro 1, existem valores de referência para a interpretação dos resultados analíticos (LQARS, 2006), os níveis críticos. Estes níveis permitem determinar casos de deficiência, adequação e toxicidade de um elemento como o N em dada amostra e a recomendação de medidas para a sua correcção.

Quadro 1 – Época de colheita do órgão ou parte da planta indicado para constituir uma amostragem para análises foliares e intervalos normais de azoto nas folhas de oliveira (Elaborado a partir de LQARS, 2006; Fernández-Escobar, 2008; DGADR, 2010).

Época de colheita	Órgão ou parte da planta a colher	Teores foliares de N considerados adequados (expressos em percentagem em relação à matéria seca a 100-105°C)
Endurecimento do caroço (Julho/Agosto)	Folhas inteiras e sãs do terço médio dos lançamentos da Primavera anterior, inseridos à mesma altura da copa, colhendo 4 a 8 folhas por árvore, uma em cada lançamento, segundo os quatro pontos cardeais	1,50 – 2,00
Repouso vegetativo (Dezembro/Janeiro)		1,60 - 2,10

2.6. Técnicas de avaliação do azoto na planta

Apesar do teor foliar de azoto total (NT) ser tradicionalmente utilizado para estimar o estado de N na oliveira, uma vez atingido o nível nutricional azotado necessário para o crescimento e produção da planta, o NT aumenta muito pouco ou até mesmo nada (Rubio-Covarrubias *et al.*, 2009). Esta situação resulta da redistribuição do N em excesso por via floémica para frutos, folhas e lançamentos mais jovens (Taiz e Zeiger, 1998). Assim, aplicações excessivas de fertilizantes azotados são difíceis de diagnosticar utilizando o NT como único indicador. Um método de diagnóstico preciso deve reflectir a disponibilidade do N no ambiente exterior e a entrada deste nutriente na planta, não apenas no intervalo de deficiência mas também, naquele de consumo de luxo. A sensibilidade a uma vasta gama de aplicações do nutriente é um parâmetro a realçar num bom indicador de N, prevendo produtividades e crescimentos; de preferência deve poder ser obtido através de métodos não destrutivos. As formas móveis de azoto, como o nitrato, o amónio e os

aminoácidos, têm vindo a demonstrar uma maior taxa de acumulação ao aumento do fornecimento de N relativamente ao NT (Rubio-Covarrubias *et al.*, 2009). Andrews (1986), Gojon *et al.* (1991) e Schjoerring *et al.* (2002), mencionados no trabalho de Rubio-Covarrubias *et al.* (2009) defendem que face a um elevado consumo de N, a redução de NO_3^- é incompleta nas raízes e nem todo o NH_4^+ é incorporado em aminoácidos. Consequentemente, os iões NO_3^- e NH_4^+ podem ser transportados para os novos crescimentos da planta. Esta situação explica o facto de concentrações foliares de N-NH_4^+ e N-NO_3^- serem muito sensíveis ao elevado fornecimento de N e, como tal, possivelmente bons indicadores da quantidade em excesso de N no solo. Por outro lado, componentes estáveis de N, como NT, são bons indicadores de deficiência. A combinação das duas técnicas pode ser um bom meio de diagnóstico do azoto na planta para um intervalo abrangente de disponibilidade de N.

Lea (1993), citado em Surabhi *et al.*, 2008, referiu que em todas as plantas lenhosas de grande porte, o azoto inorgânico é primeiramente reduzido a amónio antes de qualquer incorporação em formas orgânicas. Na planta, o nitrato sofre redução no citosol pela nitrato-redutase (NR), dando origem ao nitrito, sendo este, por sua vez, reduzido a amónio nos cloroplastos pela enzima nitrito-redutase (NiR). Esta forma azotada reduzida está agora disponível para as plantas a incorporarem em aminoácidos portadores de N (Figura 2). As enzimas glutamina-sintetase (GS) e glutamato-sintase estão envolvidas na biossíntese destes aminoácidos (Debouba *et al.*, 2006; Ruiz *et al.*, 2007; Gajewska e Sklodowska, 2009). A quantificação da actividade enzimática das enzimas NR (Kaiser e Lewis, 1984; Hassan *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2008; Nicodemus *et al.*, 2008; Roosta *et al.*, 2009) e GS (Kaiser e Lewis, 1984; Liu *et al.*, 2008; Roosta *et al.*, 2009) constitui uma forma de monitorizar a absorção de NO_3^- e NH_4^+ e como tal, uma ferramenta muito útil na procura da forma azotada, ou combinação de formas, mais adequada para a fertilização de jovens oliveiras, implicando menores gastos energéticos e aumentos de produtividade.

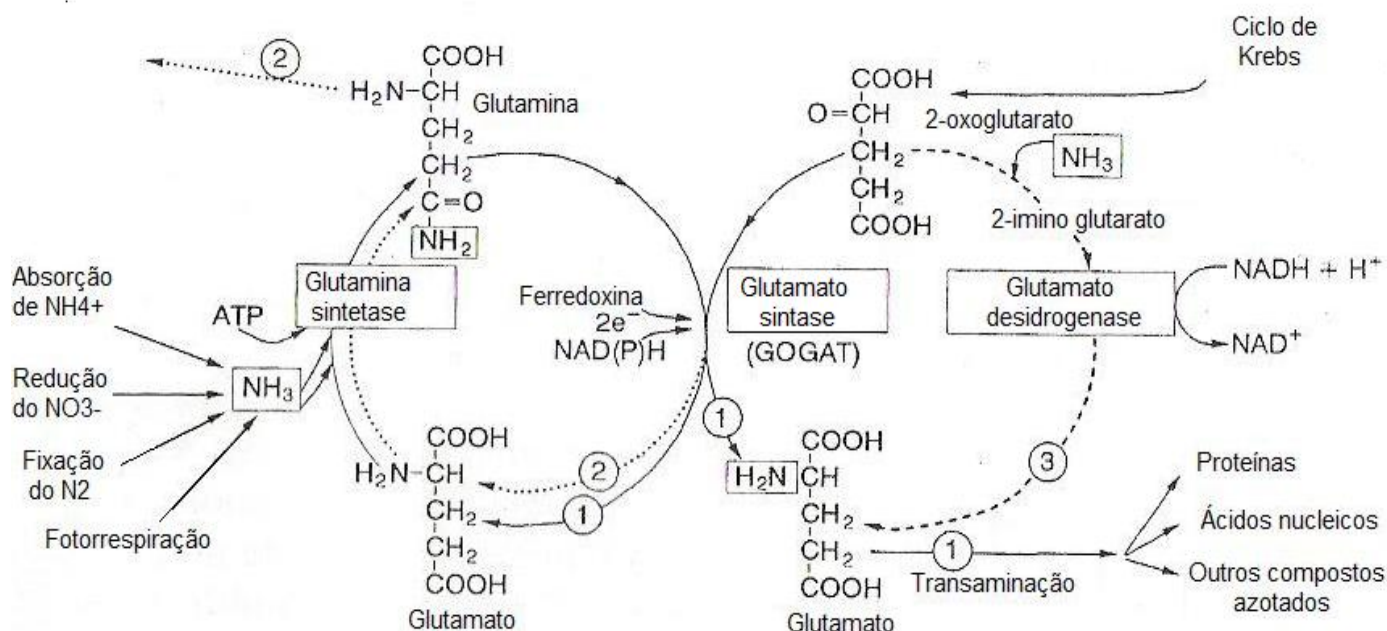


Figura 2 – Modelo das vias de assimilação do amoníaco (1,2) Via glutamina-sintetase-glutamato-sintase, com baixo fornecimento de NH_3 (1) e com elevado fornecimento de NH_3 (2). (3) Via glutamato desidrogenase. (Adaptado de Marschner, 1995)

2.7. Contaminação das águas lixiviadas com nitrato

O azoto é dos nutrientes utilizados na fertilização de culturas mais susceptível de causar poluição das águas superficiais e subterrâneas (Schepers, 2008).

Apesar dos aquíferos subterrâneos se encontrarem mais protegidos da contaminação esta ocorre quando, por lixiviação, a água da chuva ou de irrigação ao percolar o solo arrasta consigo substâncias dissolvidas. A intensidade desta lixiviação é afectada pelas interacções entre as formas iónicas dos elementos químicos e a fase sólida do solo, condicionando as reacções de adsorção e a retenção dos iões nas partículas do solo (Resende, 2002). Desta forma, a natureza do nutriente e as propriedades do solo são factores cruciais na deslocação e potencial de contaminação de dado nutriente no solo (Resende, 2002; Sánchez Pérez *et al.*, 2003).

As águas superficiais são afectadas pelo arrastamento na superfície do solo de qualquer uma das formas químicas do azoto, uma vez que à superfície o teor deste elemento é sempre mais elevado, como consequência da maior quantidade de matéria orgânica nesta zona. A infiltração do N-nítrico, forma menos passível de ser retida, tanto física como quimicamente, ao longo do perfil do solo, causa um enriquecimento de azoto nas águas subterrâneas.

Embora o amoníaco (NH_3) quando presente na água em elevadas concentrações atinja níveis tóxicos para os peixes, este elemento quando no solo ou aplicado via fertilizantes, tende a ser rapidamente convertido a ião amónio (NH_4^+) que por sua vez é convertido a nitrato, como referido no capítulo 2.3.1.1. A poluição das águas por nitratos é a situação mais corrente e de difícil eliminação (Santos, 1995), tendo vindo a atingir níveis perigosos para a actividade humana (Costa *et al.*, 2002; Sánchez Pérez *et al.*, 2003). As quantidades de nitrato presentes ou adicionadas ao solo, a permeabilidade deste, as condições climáticas como a pluviosidade e o modo como é efectuada a irrigação, são situações que se destacam no potencial de contaminação do nitrato (Sánchez Pérez *et al.*, 2003; Resende, 2002).

Ao longo dos últimos 60 anos tem-se verificado um aumento dramático do uso de fertilizantes azotados/fosforados/potássicos (NPK), principalmente na América do Norte e na Europa. A lixiviação de N e P resultante de aplicações excessivas na actividade agrícola, é considerado o principal motivo da eutrofização das águas pelo Mundo todo (Stefanelli, 2010).

Em Portugal, os teores de nitratos nas águas são já preocupantes, havendo seis zonas em Portugal Continental e oito nos Açores onde os teores superam os níveis admissíveis para consumo humano (50 mg/L). Nestas zonas, a aplicação de fertilizantes é condicionada, obrigando os produtores a cumprir um conjunto de regras pré-estabelecidas no *Código de Boas Práticas Agrícolas. Protecção das Águas contra a Poluição com Nitratos de Origem Agrícola*, publicado pelo MADRP (1997) (LQARS, 2006). Medidas como a aplicação fraccionada de fertilizantes azotados, épocas de aplicação bem estudadas, recurso à fertirrega, a fontes de N alternativas e aplicações foliares, são algumas das medidas mencionadas por vários autores referidos em Stefanelli (2010), que reduzem a poluição das águas subterrâneas com N.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os dados experimentais que estiveram na base da elaboração do presente trabalho foram obtidos em dois ensaios de fertilização. Ambos os ensaios tiveram lugar no Horto de Química Agrícola Boaventura de Azevedo, do Instituto Superior de Agronomia em jovens oliveiras da cultivar Cobrançosa, no período compreendido entre Abril de 2009 e Junho de 2010. As plantas foram adquiridas no mês de Abril de 2009 já com um ano de idade, no Departamento de Olivicultura, do Instituto Nacional de Recursos Biológicos em Elvas.

O ensaio que se irá considerar em primeiro lugar avalia a influência da adubação azotada no crescimento e na actividade de duas enzimas envolvidas na assimilação do azoto. O segundo ensaio pretendeu avaliar as perdas de N por lixiviação dos sais azotados utilizados.

3.1. Instalação dos ensaios

As jovens oliveiras utilizadas nos dois ensaios tinham um ano de idade, aproximadamente 60 cm de ramo principal e as raízes protegidas por um torrão de substrato Siro Oliva. Este substrato é composto por húmus Siro[®] Agro 1, turfas loiras, estrume maturado de cavalo e 1 kg/m³ de adubo de libertação controlada de 12-14 meses, sendo as características (standard) evidenciadas no Quadro 2.

Quadro 2 – Características físico-químicas do substrato Siro Oliva

pH em CaCl₂	6,0-6,5
Humidade	50-60%
Condutividade	1,3 dS/m
Azoto (N)	30-50 mg/l
Fósforo (P₂O₅)	30-50 mg/l
Potássio (K₂O)	300-400 mg/l
Matéria Orgânica	70%

Uma vez no Horto de Química Agrícola, todas as plantas foram pesadas, etiquetadas e envasadas durante o mês de Maio de 2009.

O solo utilizado no envasamento foi colhido no campo experimental da Horta do Instituto Superior de Agronomia e crivado no próprio local com um crivo de 5 mm de

diâmetro. 59 oliveiras foram plantadas em vasos do tipo Kick-Brauckmann com sensivelmente 8,3 quilograma de terra. Estes vasos são de polietileno branco, de parede dupla e quimicamente inertes. Depois de envasadas e regadas com 750 ml de água desmineralizada, 9 das oliveiras foram deixadas ao ar livre, enquanto as restantes foram colocadas na bancada porta-vasos. Esta bancada move-se no interior da estufa de vidro, sendo deslocada para o exterior, protegido por uma rede, sempre que se verificava ausência de chuva. Era recolhida para o interior sempre que chovia para, assim, se evitar adições de água pluviométrica impossíveis de contabilizar.

A estufa apresentava um sensor de temperatura que permitia a abertura ou fecho das suas janelas laterais e de topo para aumentar ou diminuir o seu arejamento e, consequentemente, diminuir ou aumentar a temperatura.

As jovens oliveiras foram mantidas durante cinco meses em igualdade de condições no respeitante à rega, recebendo cada oliveira em média 250 ml de água desmineralizada de 2 em 2 dias, visto nos encontrarmos em pleno Verão. Com o aproximar da época invernal, a rega foi sendo gradualmente diminuída, realizando-se de acordo com as necessidades. Passados os meses iniciais de crescimento, em que todas as plantas se adaptaram às novas condições, em Agosto de 2009 foram seleccionados aleatoriamente, etiquetados e numerados cinco lançamentos de cada árvore, de forma a monitorizar o seu desenvolvimento, através da recolha de dados biométricos no decorrer do ensaio.

3.1.1. Protecção fitossanitária

No final do mês de Agosto de 2009 as oliveiras começaram a evidenciar sinais de ataque de insectos da ordem *Thysanoptera*, genericamente chamados de Tripes, e de uma praga roedora, cujos sintomas eram a formação de galerias nas folhas e o aparecimento de rebentos roídos. Como tal, foi aplicado um insecticida organofosforado sistémico (doseava 38,1% (p/p) de dimetoato) na concentração de 750 µl/L. Cerca de 6 semanas após a aplicação ocorreu uma reincidência de ataques, levando a nova aplicação nas mesmas condições.

3.2. Caracterização do solo

O solo utilizado foi classificado, segundo SROA/CNROA (Cardoso, 1974), como “Cbc – Barros Castanho-Avermelhados, calcários Não Descarbonatados, de basaltos ou doleritos ou outras rochas eruptivas ou cristalofílicas básicas associados a calcário friável”. Na classificação da FAO (2006), este solo corresponde à unidade Vertissolo.

No quadro 3 constam algumas características físico-químicas do solo usado.

Quadro 3 – Algumas características físicas e químicas do solo da Tapada da Ajuda

Características	Profundidade (0-20 cm)	Método de análise *
Classificação textural	Argilosa	Método expedito
Matéria orgânica (g/kg)	17,1	Oxidação por via húmida (Tinslay)
pH (H₂O)	6,97	Potenciómetro
pH (KCl)	5,97	Potenciómetro
P₂O₅ (mg kg⁻¹)	545	Egner-Riehm
K₂O (mg kg⁻¹)	248	Egner-Riehm
Ca²⁺ de troca (cmol₍₊₎ kg⁻¹)	27,23	Bases de troca acetato de amónio
Mg²⁺ de troca (cmol₍₊₎ kg⁻¹)	6,57	Bases de troca acetato de amónio
K⁺ de troca (cmol₍₊₎ kg⁻¹)	0,6	Bases de troca acetato de amónio
Na⁺ de troca (cmol₍₊₎ kg⁻¹)	0,48	Bases de troca acetato de amónio
N-NH₄⁺ (mg kg⁻¹)	6,94	Auto-analisador
N-NO₃⁻ (mg kg⁻¹)	2,48	Auto-analisador

*Métodos em uso no Laboratório de Análise de Solos do Departamento de Química Agrícola e Ambiental

3.3. Condições climáticas

A região de Lisboa encontra-se inserida numa zona de clima temperado e moderado, sem quedas regulares de neve, com Verão quente e chuvas moderadas no Inverno. Corresponde-lhe a forma climática Csa da classificação de Köppen, isto é, um clima mesotérmico (temperado), com estação seca no Verão, coincidente com a época mais quente: temperatura média do ar no mês mais quente é superior a 22°C, enquanto que a do mês mais frio está compreendida entre os 0 e 18°C; a quantidade de precipitação no mês mais seco é inferior a um terço da do mês mais chuvoso do semestre frio e inferior a 40 mm.

Pela classificação de Thornthwaite, o clima da região é descrito por C₁B₂'sa', o que significa que é sub-húmido seco (índice hídrico compreendido entre -20°C e 0%), 2º mesotérmico (evapotranspiração potencial no ano de 712 e 855 mm), com índices

de humidade entre os 10 e os 20% e com eficácia térmica no Verão inferior a 48% (SMN, 1965).

A importância que os factores climáticos assumem no ciclo vegetativo das plantas, assim como no desenvolvimento de pragas e doenças, no comportamento dos fertilizantes no solo e na absorção de nutrientes levaram a que apresentasse na figura 3, os valores da temperatura média mínima e máxima do ar e os valores da precipitação total, registados desde a instalação do ensaio (Abril de 2009). Estes dados foram fornecidos pelo Departamento de Ciências do Ambiente, Secção de Agrometeorologia, Lisboa (38° 42' N e 9° 03' W; 60 m altitude).

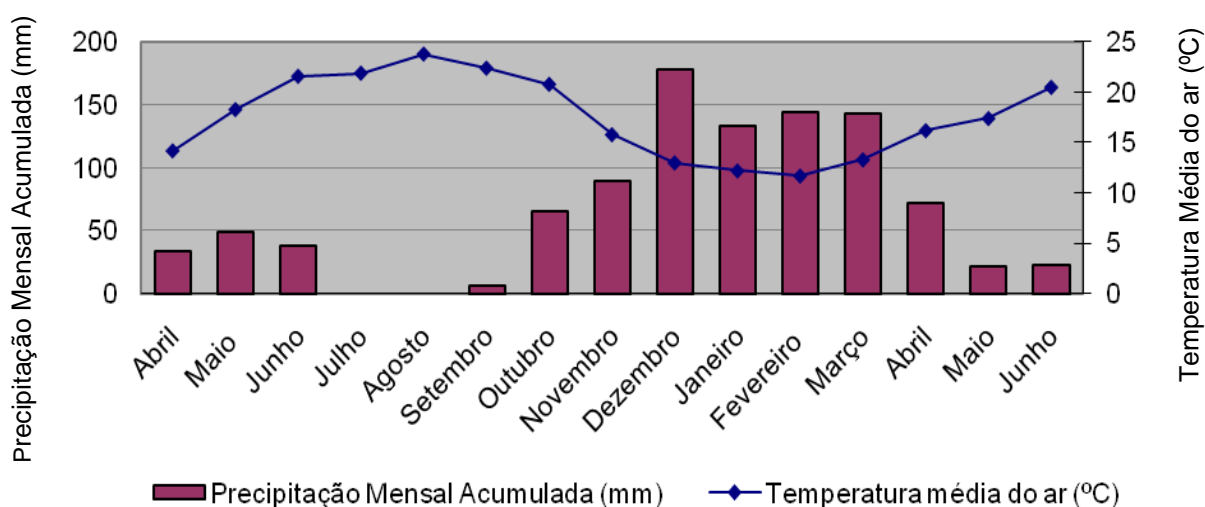


Figura 3 – Precipitação mensal acumulada (mm) e temperatura média mensal registadas na estação meteorológica do Departamento de Ciências do Ambiente, Secção de Agrometeorologia em Lisboa entre Abril de 2009 e Julho 2010.

3.4. Cultivar

Neste ensaio foram estudadas oliveiras da cultivar Cobrançosa. Segundo Leitão *et al.* (1986) esta cultivar transmontana é muito regular e produtiva, possui porte pequeno ou médio enquanto que a sua arborescência é mediana. Aprecia solos férteis.

O seu fruto é de porte médio e elipsoidal mas, apesar da sua baixa resistência ao desprendimento, tem uma queda reduzida (Leitão *et al.*, 1986; DGADR, 2010), como tal considerada muito apropriada para a colheita por vibração. O fruto não é utilizado normalmente para conserva e apresenta um bom rendimento em azeite, o qual é medianamente rico em ácido linoleico.

Trata-se de uma cultivar pouco propensa a doenças de folhagem e acidentes climáticos (Leitão *et al.*, 1986).

3.5. Caracterização dos ensaios

3.5.1. Avaliação da resposta de oliveiras jovens cv. Cobrançosa à adubação azotada (Ensaio A)

3.5.1.1. Delineamento experimental

Tendo por objectivo avaliar a influência da adubação azotada nítrica e amoniacal no desempenho da cultivar Cobrançosa, consideraram-se 4 níveis de azoto: N0 – 0 kg/ha, N1 – 30 kg/ha, N2 – 60 kg/ha e N3 – 90 kg/ha.

A relação azoto nítrico:azoto amoniacal também foi testada pelo que, para cada nível de azoto consideraram-se 3 tipos de formulações $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ e 5 repetições por tratamento. Para a modalidade 100:0 recorreu-se ao nitrato de cálcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$), para 50:50 o nitrato de amónio (NH_4NO_3) e para 0:100 o sulfato de amónio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) (Quadro 4).

3.5.1.2. Adubação azotada

As quantidades aplicadas, que se encontram evidenciadas no Quadro 4, foram fraccionadas em três aplicações iguais.

As adubações foram realizadas a 30 de Setembro, 30 de Outubro e a 30 de Novembro de 2009. Consistiram na aplicação de 50 ml de solução por vaso preparada com o nível de N e proporção $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ correspondente. Para facilitar a infiltração dos sais no solo, realizou-se logo em seguida uma rega de 250 ml de água desmineralizada.

Quadro 4 – Níveis de azoto e proporções $\text{NO}_3^- : \text{NH}_4^+$ aplicados a cada planta em Setembro, Outubro e Novembro de 2009 a jovens oliveiras cv. Cobrançosa

Doses de N		Proporção $\text{NO}_3^- : \text{NH}_4^+$	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	NH_4NO_3	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
kg ha^{-1}	g vaso^{-1}		g vaso^{-1}	g vaso^{-1}	g vaso^{-1}
0	0	-	-	-	-
30	0,1250	100:0	1,0542	-	-
		50:50	-	0,3573	-
		0:100	-	-	0,5900
60	0,2500	100:0	2,1084	-	-
		50:50	-	0,7146	-
		0:100	-	-	1,1800
90	0,3750	100:0	3,1626	-	-
		50:50	-	1,0719	-
		0:100	-	-	1,7700

3.5.1.3. Avaliação de parâmetros biométricos das oliveiras

3.5.1.3.1. Material vegetal

A oliveira desenvolve-se e frutifica mesmo face a um restrito volume onde desenvolver o seu sistema radicular, situação frequente nos vasos utilizados para ensaios (Milheiro, 1992c). Apesar de se tratar de uma espécie de crescimento relativamente lento assim como de elevada arborescência, a sua adaptabilidade a ensaios em vasos fez com que fossem considerados os parâmetros biométricos para avaliação dos efeitos da adubação azotada. Foram medidos o diâmetro do tronco, a altura das árvores e o comprimento dos lançamentos no período compreendido entre Setembro de 2009 e Junho de 2010. Todas as oliveiras objecto de estudo eram homogéneas estatisticamente em termos de diâmetro do tronco, comprimento dos raminhos e eixo central, antes do início das adubações.

a) Diâmetro do tronco

O diâmetro do tronco de cada árvore foi medido cerca de 10 cm acima da zona de inserção no solo, com recurso a um paquímetro. As medições foram efectuadas no final de Setembro e Junho de 2010.

b) Altura das árvores

A altura das árvores foi medida com o auxílio de uma fita métrica, graduada em mm, desde a zona marcada para a medição do diâmetro do tronco (referida em a), até à extremidade do lançamento mais elevado (normalmente o eixo da árvore).

c) Comprimento dos lançamentos

Ao longo do período em estudo, uma a duas vezes por mês, foram medidos e registados os comprimentos dos cinco lançamentos previamente seleccionados por oliveira.

3.5.1.4. Contagem do número de inflorescências e frutos

Determinou-se o número total de inflorescências por oliveira a meados de Março de 2010, assim como o número de frutos no final de Maio do mesmo ano.

3.5.1.5. Determinação do teor de azoto nas folhas

a) Colheita das amostras

Para o acompanhamento do estado de nutrição azotada das oliveiras, colheram-se amostras de oito folhas por árvore, em Janeiro e Fevereiro de 2010, durante a manhã. Desta amostra, cinco das folhas (uma de cada lançamento marcado) foram utilizadas nos ensaios enzimáticos e de determinação de azoto nítrico e amoniacal livres, enquanto as outras três folhas (recolhidas ao acaso de ramos não marcados) destinaram-se a determinações do teor de azoto total. As folhas foram colhidas para folhas de papel alumínio previamente marcadas e mantidas em gelo até a sua preparação.

b) Preparação das amostras

No laboratório, as amostras foliares foram lavadas e pesadas em fresco. As cinco folhas dos lançamentos marcados foram ainda cortadas a meio pela nervura principal, com auxílio dum xisato.

Para a determinação do teor de azoto total e para a quantificação do azoto amoniacal e nítrico livres, as cinco meias folhas assim como as três folhas de

lançamentos aleatórios foram secas em estufa de ventilação forçada a 65°C durante quarenta e oito horas. As amostras foram posteriormente moídas num moinho tipo Wiley com um crivo com 40 malhas por polegada linear (40 mesh), reduzindo o conjunto de amostragem a partículas de diâmetro inferior a 1mm.

Para o ensaio enzimático (estudo da actividade da nitrato-redutase (NR) e da glutamina-sintetase (GS)), as restantes cinco meias folhas foram congeladas em azoto líquido e armazenadas a -80°C.

c) Métodos de determinação laboratorial

Quando não é mencionado, os reagentes foram comprados a José Manuel Gomes dos Santos e à Sigma.

c.1) Teor de azoto total

Este parâmetro foi determinado pelo método modificado de Kjeldahl (ISO 11261:1995(E)) através da digestão, a quente, com a mistura de ácido sulfo-salicílico e ácido sulfúrico, de aproximadamente 0,2 g de amostra seca num Digestor DK20 (Velp Scientifica) e destilação numa unidade de destilação Kjeltex System 1026 da Tecator (FOSS Analytical), com excesso de hidróxido de sódio. O amoníaco libertado durante a destilação foi recolhido em ácido bórico a 4%, seguido de titulação com ácido clorídrico a 0,0739 N, usando um indicador misto (verde de bromocresol e vermelho de metilo). O teor total de azoto nas folhas é expresso em percentagem, relativamente à matéria seca a 105°C.

c.2) Teor de azoto amoniacal e nítrico

Os iões nitrato e amónio livres foram determinados após extracção com água destilada, recorrendo-se a um auto-analisador de fluxo segmentado da marca SKALAR. A amostra vegetal foi agitada mecanicamente durante 2 horas com água destilada numa proporção de 1:100 (0,1 g amostra para 10 ml água), seguida de centrifugação durante 5 minutos a 3000 rpm, para obtenção de extractos.

O azoto amoniacal foi determinado pelo método de Berthelot modificado (Husted *et al.*, 2000), com leitura dos extractos por espectrofotometria de absorção molecular, a um comprimento de onda de 660 nm. É expresso em mg por kg de matéria seca.

O azoto nítrico foi determinado utilizando o método de sulfanilamida (Kempers e Luft, 1988), após redução dos nitratos em coluna de cádmio, com leitura dos extractos por espectrofotometria de absorção molecular a um comprimento de onda de 540 nm. É expresso em mg por kg de matéria seca a 105°C.

c.3) Ensaio enzimáticos

Na preparação do extracto enzimático as folhas, previamente congeladas, foram sujeitas a moenda em almofariz com azoto líquido e em seguida, a cada amostra foi adicionada 2,5 ml de solução tampão (Liu *et al.*, 2008) e a 12,5 µl de antioxidante β-mercaptoetanol (βME). Foi feita uma primeira centrifugação de 5 minutos a 3000 rpm e, depois do sobrenadante ter sido filtrado através do tecido miracloth, uma última a 15 000 rpm durante 20 minutos. Ambas as centrifugações foram realizadas à temperatura de 4°C.

Tanto a actividade da enzima nitrato-redutase como a da glutamina-sintetase foram reportadas ao teor de proteínas solúveis existentes na solução. O método adoptado para a medição deste teor proteico foi o de Bradford (Bradford, 1976), em que se recorreu ao soro de albumina bovina (BSA) na concentração de 1,4 mg/ml como standard. O reagente de Bradford (Biorad) foi filtrado e diluído em água destilada (1:5).

c.3.1) nitrato-redutase (NR)

Para o ensaio da NR seguiu-se a metodologia de Kaiser e Lewis (1984) numa escala duas vezes inferior, em se utilizou a solução tampão anteriormente referida para a extracção. O nitrito formado foi detectado colorimetricamente a 540 nm depois do azo-acoplamento com a sulfanilamida e o dicloridrato de N-(1-naftil)-etilenodiamina. Cada determinação da actividade de NR foi feita em triplicado e a actividade enzimática foi expressa em µmol NO₂⁻ formado por mg de proteína total.

c.3.2) glutamina-sintetase (GS)

A extracção da GS foi levada a cabo tendo por base o mesmo método utilizado para a NR, assim como a mesma solução tampão. Utilizou-se como substrato alternativo ao NH₄⁺ a hidroxilamina e o produto da reacção, o glutamil-hidroxamato, foi medido pela absorvância a 500 nm depois de uma centrifugação a 8000 rpm durante 5

minutos. Os resultados obtidos são expressos em μmol glutamil-hidroxamato por mg de proteína total.

3.5.2. Avaliação da susceptibilidade à lixiviação pela água da chuva dos sais azotados utilizados (Ensaio B)

3.5.2.1. Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado consistiu em três tratamentos experimentais cada um com três árvores envasadas (correspondente a 3 repetições) e mantidas ao ar livre no Horto Química Agrícola Boaventura de Azevedo do Instituto Superior de Agronomia. No ensaio foram utilizados vasos do tipo Kick-Brauckman que dispunham na parte inferior de orifícios aos quais foi acoplado um frasco de plástico preto para recolha dos lixiviados. Assim como no ensaio A, realizaram-se as adubações a 30 de Setembro, 30 de Outubro e a 30 de Novembro de 2009, alturas em que se aplicou 50 ml de solução por vaso preparada com o nível de N e proporção $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ correspondente. Para facilitar a infiltração dos sais no solo, realizou-se logo em seguida uma rega de 250 ml de água desmineralizada.

Um dos grupos serviu de testemunha (0 kg de N/ha), enquanto que os outros dois foram adubados com um nível de N correspondente a 90 kg por hectare, divergindo apenas na formulação, nitrato de amónio (NH_4NO_3) num dos casos e nitrato de cálcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$) no outro.

3.5.2.2. Amostragens e determinações

3.5.2.2.1. Material vegetal

As medições biométricas, a contagem do número de inflorescências e de frutos, a análise da composição de azoto e de NH_4^+ e NO_3^- livres nas folhas e a avaliação das actividades enzimáticas de NR e GS, foram realizadas de forma idêntica à descrita no ensaio A. O mesmo se aplicou aos procedimentos de recolha e preparação das amostras de material.

3.5.2.2.2. Colheita de amostras de lixiviados

a) Recolha de amostras

Entre Outubro de 2009 e Fevereiro de 2010 foi recolhido e quantificado, uma vez por mês, o volume de lixiviados dos nove vasos que se encontravam no exterior da estufa. Para isto recorreu-se a recipientes de 3,5 L de capacidade acoplados aos vasos Kick-Brauckmann.

b) Teores de azoto amoniacal e nítrico

Os teores de azoto amoniacal e nítrico lixiviados foram determinados num auto-analisador de fluxo segmentado de marca SKALAR, segundo a metodologia já descrita em c.3). Os resultados são expressos em mg L^{-1} .

3.6. Métodos estatísticos

Para avaliação da influência das modalidades e doses de N no comportamento dos vários parâmetros em estudo, realizaram-se análises de variância (ANOVA). Foi efectuado o tratamento estatístico dos dados através do programa Statistix 9; no ensaio A realizou-se uma ANOVA simples a um factor com dez tratamentos e cinco repetições, enquanto no ensaio B se efectuou uma ANOVA simples a um factor com três tratamentos e três repetições.

Realizou-se uma estatística descritiva nos parâmetros em que não se verificaram diferenças significativas entre os tratamentos, com recurso ao mesmo software.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação da resposta de oliveiras jovens cv. Cobrançosa à adubação azotada (Ensaio A)

4.1.1. Características biométricas das árvores

a) Diâmetro do tronco

Ao calcularmos a diferença entre os diâmetros das oliveiras medidos entre Setembro de 2009 e Junho de 2010, esta não foi significativa. Esta situação revela homogeneidade de diâmetros entre as árvores sujeitas às diferentes adubações. Em média verificou-se um acréscimo de $1,12 \pm 0,65$ cm de diâmetro do tronco nas oliveiras ao longo dos 15 meses de ensaio.

b) Altura das árvores

A diferença entre os acréscimos em altura das oliveiras, calculados como as diferenças entre Setembro de 2009 e Junho de 2010, não foi significativa. Em média verificou-se um acréscimo de $23,08 \pm 15,72$ cm de altura nas oliveiras no período em estudo.

c) Comprimento dos lançamentos

Desde Setembro de 2009 até ao final de Junho de 2010, os acréscimos totais no crescimento de cada árvore, estimados através da contabilização do crescimento dos 5 ramos marcados em cada oliveira, foram semelhantes, não se tendo verificado diferenças significativas. Em média verificou-se um acréscimo de $56,14 \pm 24,15$ cm de altura nas oliveiras no período em estudo.

A ausência de resposta ao N por parte das características biométricas, durante os 15 meses do ensaio, parece sugerir que as características iniciais das árvores, mais propriamente as suas reservas de carbono e azoto, foram determinantes para o desenvolvimento vegetativo da sua parte aérea no ano de plantação. Resultados semelhantes foram obtidos por Rubio-Covarrubias *et al.* (2009), que no primeiro ano de ensaio também não detectaram diferenças significativas no diâmetro do tronco dos pessegueiros. Em Portugal, Jordão *et al.*, 2004 no seu ensaio em oliveira, cultivar

Galega, também não obtiveram respostas à aplicação de azoto em relação ao diâmetro médio do fruto, ao rendimento em azeito entre outros factores.

O facto do N influenciar não só a razão entre a parte radical e a parte aérea das árvores, mas também a própria morfologia das raízes (Marschner, 1995), leva a que alguns dos efeitos da adubação azotada diferencial nos parâmetros de crescimento medidos possam ter sido atenuados. Uma vez que só utilizámos tecido foliar no decurso do nosso trabalho e que o N absorvido poderá ter sido maioritariamente utilizado nas raízes, a influência dos tratamentos azotados poderá ter sido menor nos parâmetros biométricos.

Tratando-se de jovens oliveiras é muito provável que o seu sistema radicular ainda não tivesse atingido o seu potencial de crescimento. Sem as suas raízes completamente desenvolvidas, o volume de solo explorado seria reduzido e a eficiência de absorção de N limitada, condição que também poderá servir de explicação para os resultados obtidos.

Seria expectável que os efeitos da adubação azotada se tivessem feito notar melhor nas características biométricas, uma vez que ao contrário das árvores adultas, as árvores mais jovens detêm uma menor capacidade de reserva de N. No entanto, conforme descrito por Maeck e Tischner (1986), referidos em Tattini (1990), a assimilação de N poderá ter atingido um nível de saturação face a uma determinada quantidade de azoto fornecida, levando à diminuição da actividade das enzimas envolvidas no processo. Perante a ausência de carências observáveis de N, a entrada deste elemento na planta excedeu provavelmente a capacidade de assimilação do nutriente até nas dosagens mais baixas. Isto resultou na ausência de diferenças significativas entre o crescimento das oliveiras adubadas com o nível mais elevado de azoto, 90 kg/ha (N3) e aquelas adubadas com doses mais pequenas do nutriente ou até não adubadas. No entanto, foi possível identificar um padrão de crescimento em todas as árvores do ensaio, evidenciado nas figuras 4, 5, 6 e 7. Em conformidade com o observado por Rallo e Cuevas (2008) em Barranco *et al.*, 2008, verificou-se um pequeno crescimento vegetativo entre Setembro e Outubro, sendo que o crescimento mais pronunciado ocorreu na Primavera. A redução de temperatura no final do Outono e durante o Inverno foi um factor determinante no repouso vegetativo a que se assistiu nessa altura. A temperatura invernal na ordem dos 13°C (Figura 3) deverá ter assumido o papel de um dos factores ambientais mais importantes no estimular da floração na Primavera de 2010.

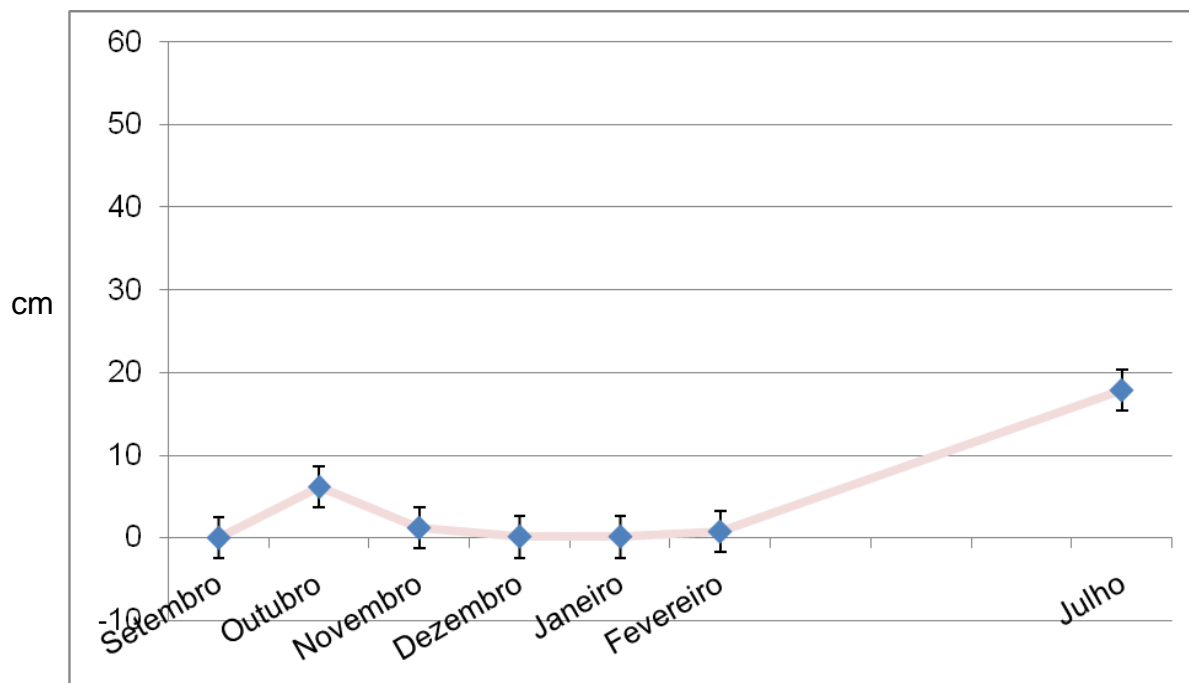


Figura 4 – Média e erro padrão dos acréscimos relativos ao comprimento dos 5 ramos marcados por árvore nas oliveiras testemunha.

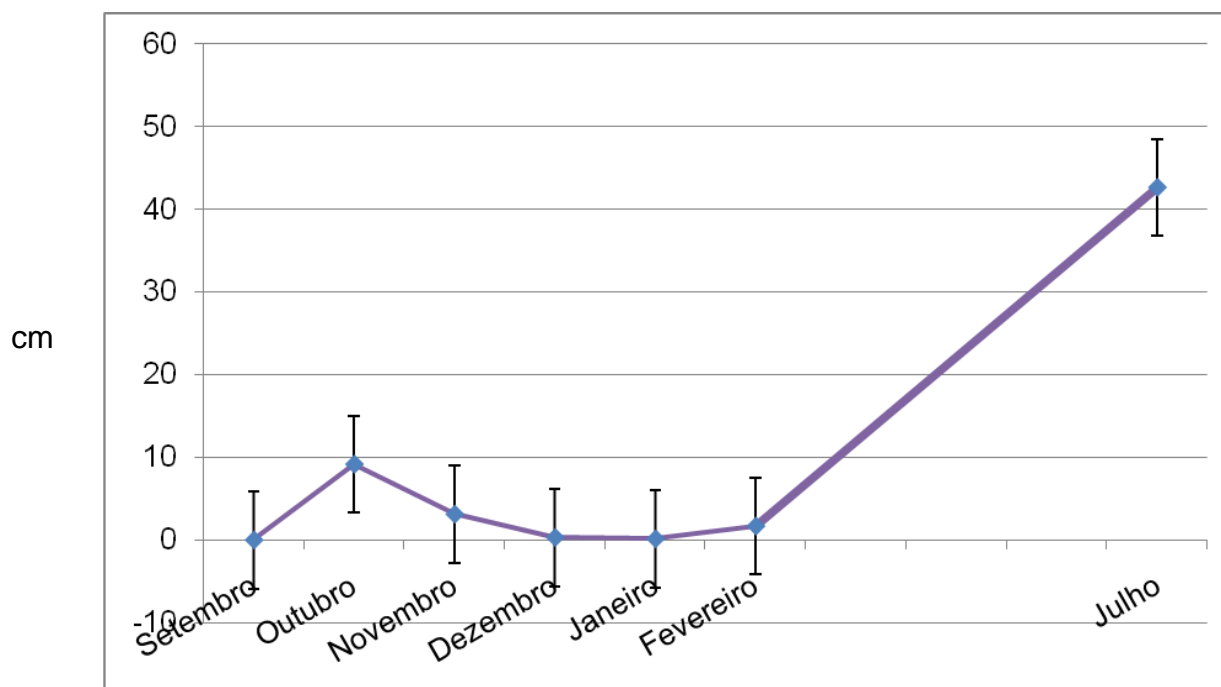


Figura 5 – Média e erro padrão dos acréscimos relativos ao comprimento dos 5 ramos marcados por árvore, nas oliveiras sujeitas à adubação azotada de 30 kg/ha.

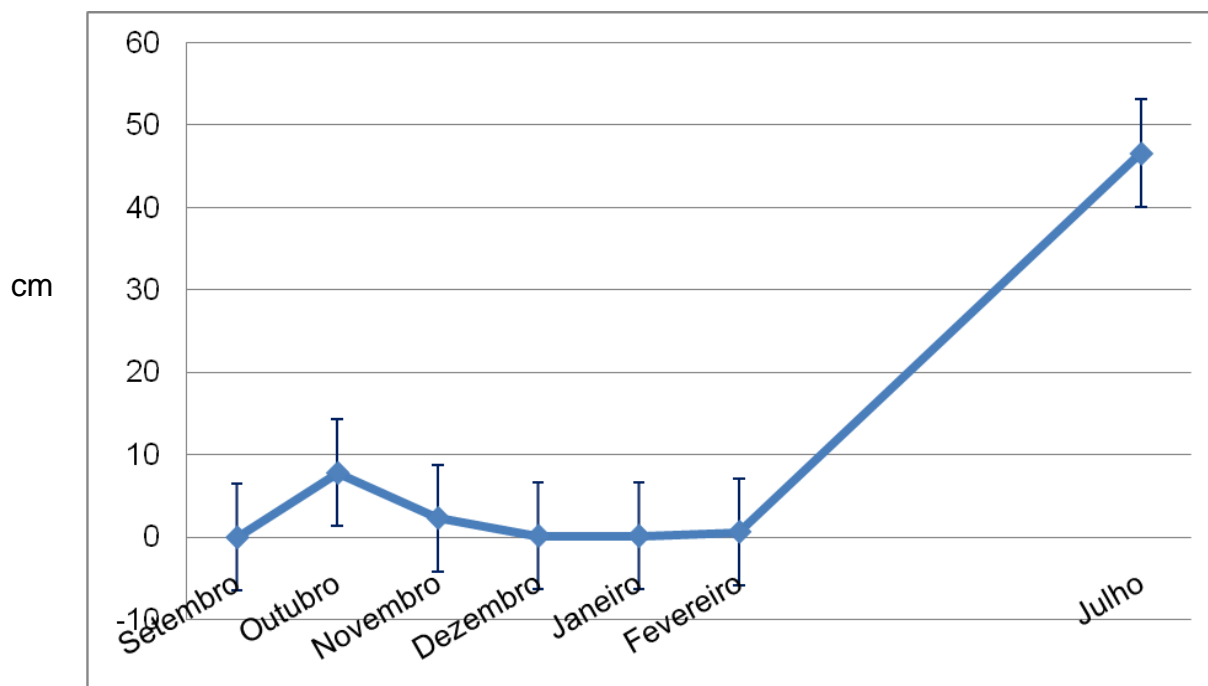


Figura 6 – Média e erro padrão dos acréscimos relativos ao comprimento dos 5 ramos marcados por árvore, nas oliveiras sujeitas à adubação azotada de 60 kg/ha.

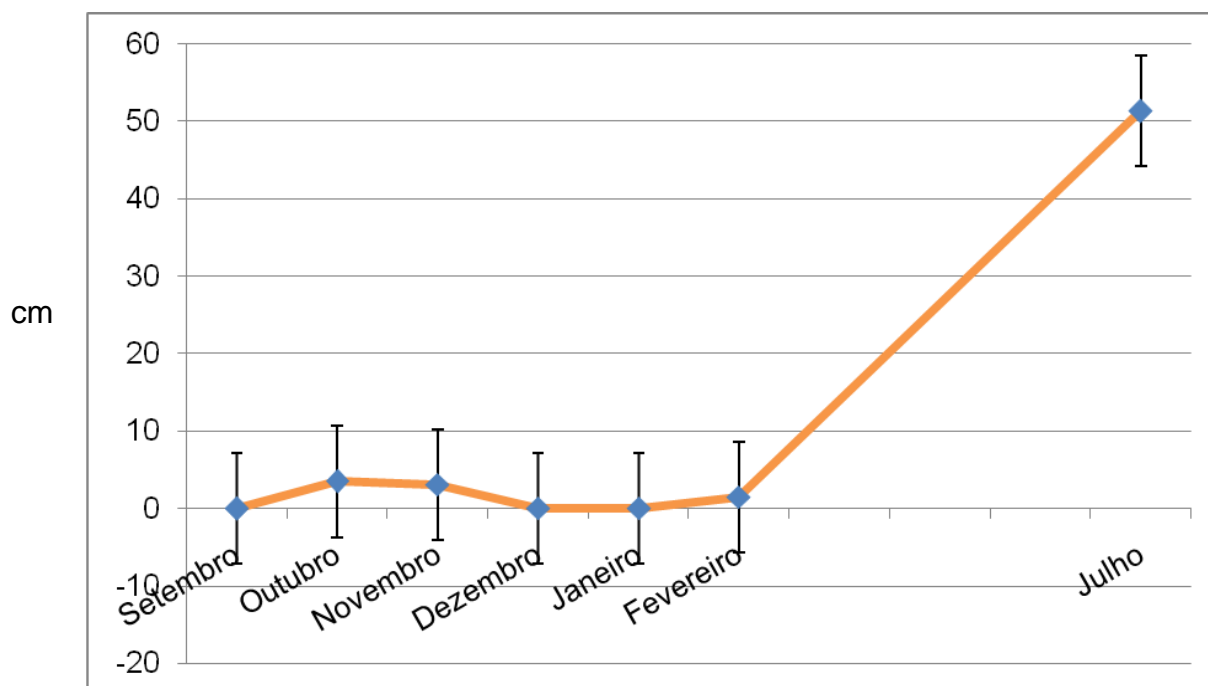


Figura 7 – Média e erro padrão dos acréscimos relativos ao comprimento dos 5 ramos marcados por árvore, nas oliveiras sujeitas à adubação azotada de 90 kg/ha.

4.1.2. Contagem de inflorescências e frutos

Na avaliação do número de inflorescências das oliveiras sujeitas às diferentes doses e formulações de N, os resultados obtidos não demonstraram diferenças significativas. Obteve-se uma média de 38 inflorescências e 7 frutos por árvore no conjunto de todas as árvores. As reservas iniciais azotadas das plantas e/ou do próprio solo terão sido suficientes para o desenvolvimento reprodutivo das oliveiras, uma vez que tanto o número de inflorescências como o número de frutos, se mostrou dentro dos valores normalmente obtidos pela cultivar Cobrançosa (Leitão *et al.*, 1986). No seu ensaio em solos férteis na Califórnia, Hartmann (1958) também não encontrou variações na produção de inflorescências e frutos nas oliveiras em estudo face à aplicação de azoto. O mesmo foi observado por Jordão *et al.* (2004) na produção de azeitona depois de realizadas fertilizações com diferentes níveis de azoto (0, 30, 60 e 120 kg/ha).

A influência da adubação azotada nestas oliveiras fazer-se-á talvez notar na próxima floração, atendendo que as reservas iniciais de N já tenham sido esgotadas e o sistema radicular das oliveiras se tenha desenvolvido por completo, levando a que as plantas recorram ao azoto fornecido ao solo no final do Verão de 2009 para o desenvolvimento vegetativo dos raminhos (onde se irá dar a floração).

4.1.3. Teor de azoto nas folhas

4.1.3.1. Azoto total

No quadro 5 apresentam-se os valores médios das concentrações foliares de azoto total obtidas nas épocas de amostragem de Janeiro e Fevereiro de 2010 por tratamento experimental. Alguns encontram-se fora do intervalo adequado à época em que foi realizada a amostragem, mais propriamente no repouso invernal (LQARS, 2006; Fernández-Escobar, 2008; DGADR, 2010). Tendencialmente, os níveis de azoto total superiores corresponderam a amostras sujeitas a maiores dosagens de N aplicado.

Quadro 5 - Teores de azoto total (% m.s) nas folhas do terço médio dos lançamentos do ano colhidas durante o repouso Invernal (Janeiro e Fevereiro) nas diferentes doses e formulações de azoto. Cada amostra resultou da amostra compósita de 5 repetições.

Data recolha amostras	Dose de N (kg/ha)	NO ₃ ⁻ :NH ₄ ⁺	% N (m.s)	Média da % N (m.s)
Jan-10	0	-	1,71	1,71
	30	100:0	2,13	1,98
		50:50	1,94	
		0:100	1,88	
	60	100:0	2,20	2,08
		50:50	1,99	
		0:100	2,04	
	90	100:0	2,36	2,27
		50:50	2,30	
		0:100	2,16	
Fev-10	0	-	1,66	1,66
	30	100:0	1,82	1,98
		50:50	2,00	
		0:100	2,13	
	60	100:0	2,14	2,07
		50:50	1,92	
		0:100	2,16	
	90	100:0	2,16	2,09
		50:50	1,95	
		0:100	2,15	

Verifica-se que as folhas da modalidade N3 (maior dose de N, 90 kg/ha) apresentam os maiores teores foliares de N e as testemunhas (N0) os menores. Os teores médios de azoto alusivos aos tratamentos de 60 e 90 kg/ha não diferem muito entre si, no entanto em média e em ambos os meses de Janeiro e Fevereiro, excederam os 2%, não sendo considerados adequados. Inversamente os teores de 0 e 30 kg/ha conduziram a teores considerados suficientes (LQARS, 2006).

4.1.3.2. Teores de NH_4^+ e NO_3^- livres

As determinações do azoto nítrico e amoniacal livres nas folhas, obtidos no mês de Janeiro e de Fevereiro de 2010, estão representadas no quadro 6.

Quadro 6 – Valores dos teores foliares de ião amónio e ião nitrato livres nas jovens oliveiras sujeitas a diferentes doses (0, 30, 60, 90 kg/ha) e proporções de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ (100:0, 50:50, 0:100) colhidas em Janeiro e em Fevereiro de 2010. Letras iguais correspondem à inexistência de diferenças significativas para pares de médias (teste de Schéffé $P= 0,05$) (□ ldd significam valores inferiores a 0,01 mg de ião por kg de matéria seca).

Data recolha amostras	Doses de N (kg/ha)	$\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$	N- NH_4^+ (mg kg ⁻¹)	Média de N- NH_4^+ (mg kg ⁻¹)	N- NO_3^- (mg Kg ⁻¹)
Jan-10	0	-	43,21	43,21	□ ldd
	30	100:0	47,48	45,48	□ ldd
		50:50	42,43		□ ldd
		0:100	46,54		□ ldd
	60	100:0	57,69	55,27	0,39
		50:50	52,23		□ ldd
		0:100	55,88		□ ldd
	90	100:0	69,70	67,53	1,66
		50:50	61,07		□ ldd
		0:100	71,81		0,78
Fev-10	0	-	37,78	37,78	3,89
	30	100:0	41,83	40,74	□ ldd
		50:50	40,94		□ ldd
		0:100	39,44		□ ldd
	60	100:0	42,82	43,88	□ ldd
		50:50	44,62		□ ldd
		0:100	44,20		□ ldd
	90	100:0	54,74	54,71	□ ldd
		50:50	51,11		3,22
		0:100	58,29		4,54

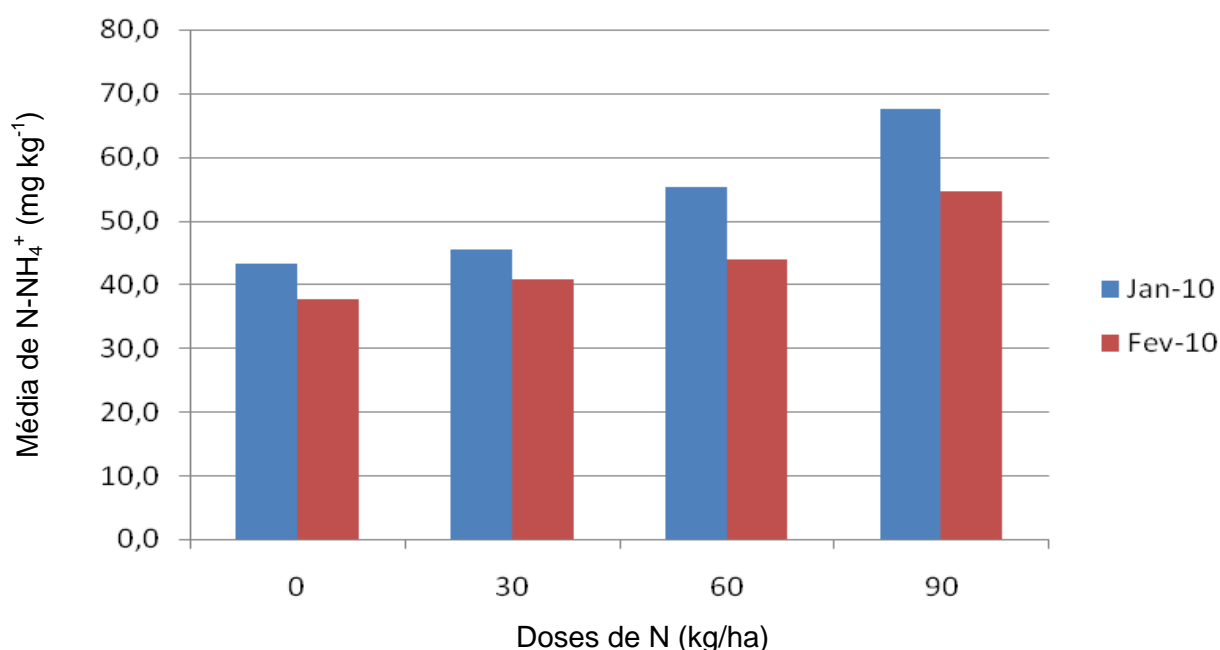


Figura 8 - Média de N-NH_4^+ (mg kg^{-1}) foliar nas jovens oliveiras sujeitas a diferentes doses (0, 30, 60, 90 Kg/ha) colhidas em Janeiro e Fevereiro.

Tanto a dose como a forma de azoto utilizadas no ensaio não conduziram a diferenças significativas nos teores foliares de iões livres azotados, em nenhum dos meses estudados. Estes resultados, assim como os valores observados para o ião NO_3^- , abaixo de $0,01 \text{ mg}$ de NO_3^- por kg de matéria seca, na maioria dos tratamentos azotados, sugerem que foi na raiz que se deu a maior parte da redução do ião NO_3^- e da assimilação do catião NH_4^+ . Rubio-Covarrubias *et al.*, em 2009, também obtiveram valores muito pequenos de N-NO_3^- em jovens pessegueiros, ao contrário de outros autores que observaram teores mais elevados de ião nitrato livre noutras espécies perenes como na noqueira (Worley, 1990, citado em Rubio-Covarrubias *et al.*, 2009), e na pereira (Ystaas, 1990, citado em Rubio-Covarrubias *et al.* em 2009).

Analisando o mês de Fevereiro de 2010 verifica-se que, as oliveiras onde foi estudada a modalidade N3 de sulfato de amónio apresentaram na sua maioria teores foliares de NO_3^- livre superiores aos restantes tratamentos. Estes dados sugerem que maiores quantidades de azoto adicionado ao solo aumentam a quantidade de ião nitrato transportado no exudado xilémico para as folhas, onde se dá parte da assimilação de N, representando menores custos energéticos para a planta. Estes resultados também podem ter sido consequência da mobilização de fotoassimilados produzidos na parte aérea para a raiz, por forma a satisfazer as exigências em esqueletos carbonados necessários para a incorporação deste ião em compostos orgânicos. Visto o ião nitrato poder ser armazenado em vacúolos até à sua redução, enquanto o NH_4^+ por ser tóxico, tem de ser rapidamente incorporado em compostos

orgânicos, a assimilação do ião amónio nas raízes pode ter sido privilegiada em detrimento da redução do ião nitrato nas folhas. Esta situação pode ter conduzido à detecção do anião nas folhas.

Foi detectado NO_3^- nas folhas das testemunhas (N0) no mês de Fevereiro que poderá ter sido proveniente do solo.

A dinâmica do azoto na planta faz com que os meses de Janeiro e Fevereiro apresentem teores de iões azotados livres ligeiramente diferentes (Quadro 6), uma vez que as quantidades de NH_4^+ e NO_3^- livres nas folhas são influenciados não só por factores ambientais, como a intensidade luminosa, mas também pelo estado nutricional da planta, concentração de N na rizosfera e disponibilidade de água no solo.

Como seria de esperar os valores foliares médios de N-NH_4^+ livre foram aumentando com a dosagem e aqueles calculados no mês de Fevereiro foram tendencialmente inferiores aos obtidos em Janeiro (Figura 8), o que poderá estar relacionado com o aproximar da época mais activa da planta.

4.1.3.3. Determinação da actividade enzimática da nitrato-redutase (NR)

Apesar da actividade da nitrato-redutase já ter sido avaliada tanto em raízes como em folhas de muitas espécies de plantas (Min *et al.*, 1998; Cruz *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2006; Tabatabaei, 2006; Li *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2008), as quantidades de nitrito detectadas colorimetricamente foram de tal modo pequenas que a actividade da enzima NR foi considerada inexistente. Estes resultados sugerem que o tratamento azotado diferencial não influenciou a resposta desta enzima nas folhas, o que nos leva a pôr em causa a eficácia do meio de extracção utilizado. Este pode não ter sido capaz de inibir os compostos fenólicos e/ou proteger a NR da degradação por enzimas proteolíticas. A utilização de uma medição *in vivo* seria um próximo passo lógico na tentativa de contabilizar a actividade da NR em jovens oliveiras e, desta forma, avaliar a influência da adubação azotada diferencial no comportamento desta enzima.

Os valores obtidos também podem ser explicados se assumirmos que a redução do ião nitrato se deu maioritariamente nas raízes. Deste modo, a actividade da NR nas folhas teria sido muito limitada, uma vez que a maioria do azoto transportado para a parte aérea já viria assimilado em aminoácidos. No trabalho de Min *et al.*, 1998, também não foi detectada qualquer actividade da NR nas folhas de *Pinus contorta*, embora esta enzima tenha estado activa nas suas raízes.

4.1.3.4. Determinação da actividade enzimática da glutamina-sintetase (GS)

A dose e a forma como o azoto foi adicionado às oliveiras não foi significativa no comportamento da glutamina-sintetase, em nenhum dos meses estudados, obtendo-se quantidades médias de glutamil-hidroxamato por proteína total semelhantes. Esta situação é evidenciada no quadro 7.

Como referido em Cruz *et al.* (2006) e Surabhi *et al.* (2008), o ciclo GS/GOGAT constitui a principal via de assimilação de amónio nas plantas em condições de crescimento normal. Deste modo, a contabilização da actividade da glutamina-sintetase permitiu-nos quantificar a assimilação do ião amónio nas folhas, com consumo de ATP, em glutamil-hidroxamato, em que o glutamato era utilizado como substrato (Kaiser e Lewis, 1984). Os resultados obtidos dizem respeito não só ao amónio resultante da adubação azotada, mas também ao amónio libertado em reacções de biossíntese e de fotorrespiração, sendo que a GS assegura a assimilação primária do azoto inorgânico, incorporando o amónio em aminoácidos, assim como participa na assimilação secundária (Miflin e Habash, 2002; Cruz *et al.*, 2006). Por uma questão de logística, e apesar da metodologia já ter sido recomendada por autores como Kronzucker *et al.*, (1999), Glass *et al.*, (2002) e Roosta *et al.*, (2009) não nos foi possível realizar o ensaio enzimático da GS com ião amónio marcado radioactivamente. Esta condição permitir-nos-ia calcular ao certo qual a quantidade de glutamil-hidroxamato por proteína total formada a partir do azoto utilizado nos tratamentos.

A aparente baixa selectividade das jovens oliveiras em combinações de NH_4^+ : NO_3^- terá sido influenciada pela actividade da enzima em causa noutros órgãos das plantas.

São factores fulcrais para a assimilação de NH_4^+ níveis adequados de poder redutor e de esqueletos carbonados. Quando o ião amónio é absorvido na raiz, tende a ser rapidamente incorporado em moléculas orgânicas no próprio órgão, contornando a toxicidade do amoníaco e ao mesmo tempo gerando reservas de azoto orgânico (Mengel e Kirkby, 2001). No entanto, a redução e futura assimilação do ião nitrato pode ter lugar tanto nas raízes como nas folhas. O facto da acção enzimática da GS nas folhas não ter divergido com as diferentes adubações poderá querer dizer que uma fracção significativa do NO_3^- absorvido, terá sido reduzido a NH_4^+ nas raízes. Esta eventualidade condiciona potenciais conclusões relativamente à preferência das jovens oliveiras quanto ao azoto nítrico e/ou amoniacal. Futuros ensaios enzimáticos a todos os tecidos da oliveira, entre os quais folhas e raízes, far-nos-ão entender melhor qual a dinâmica do azoto inorgânico nesta cultura. Nesta análise consideraram-se só

os dados de Fevereiro, pois o processamento laboratorial das amostras de Janeiro revelou incoerências que nos levaram a abandoná-las.

Quadro 7 - Valores médios do teor de glutamyl-hidroxamato/proteína total nas folhas de oliveiras adubadas com diferentes doses (30, 60, 90 kg/ha) e proporções de NO_3^- : NH_4^+ (100:0, 50:50, 0:100) colhidas em Fevereiro. Média de 5 árvores por modalidade e dose - letras iguais correspondem à inexistência de diferenças significativas para pares de médias (teste de Schéffé $P=0,05$)

Dose (kg/ha)	Proporção $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$	Média glutamyl-hidroxamato/proteína total
N0	-	9,34
30	100:0	8,10
	50:50	8,26
	0:100	8,10
60	100:0	8,92
	50:50	8,79
	0:100	9,20
90	100:0	7,80
	50:50	8,46
	0:100	8,15

4.2. Avaliação da susceptibilidade à lixiviação pela água da chuva dos sais azotados utilizados (Ensaio B)

4.2.1. Características biométricas das árvores

Assim como no ensaio A, o crescimento e o diâmetro do tronco das oliveiras mantidas no exterior, foram parâmetros não influenciados pela adubação azotada diferencial, no período em estudo. As reservas iniciais de N e C e um sistema radicular pouco desenvolvido provavelmente terão sido as principais causas para este facto, como já se havia especulado no ensaio A.

Ao comparar ambos os ensaios, constatámos que as oliveiras do ensaio B tinham tido um acréscimo médio total por árvore ($68,78 \pm 23,01$ cm) superior àquele

verificado nas árvores do ensaio A. O crescimento vegetativo das oliveiras no exterior da estufa foi privilegiado em detrimento do crescimento reprodutivo, como será mencionado no tópico seguinte.

Futuras análises de raiz ajudar-nos-ão a compreender o estado de desenvolvimento deste órgão e consequentemente o seu potencial de absorção. Estes estudos biométricos possibilitar-nos-ão saber ao certo a quantidade de azoto absorvida pela planta e deste modo, a percentagem desse azoto efectivamente utilizada.

4.2.2. Número de inflorescências e frutos

A quase ausência de características de produção, isto é, de inflorescências e frutos, levou a que não fossem consideradas relevantes na avaliação do comportamento dos adubos azotados nas oliveiras em causa. Estes números reduzidos poderiam sugerir carências de azoto, no entanto a clorose foliar, um dos primeiros indícios de deficiência deste elemento, não foi observada. Também os teores foliares de azoto estavam dentro dos valores normais ou eram mesmo altos, logo esta hipótese é posta de parte. A quase ausência de inflorescências e de frutos também não pode ser justificada pela má escolha da cultivar (Leitão *et al.*, 1986), uma vez que a cv. Cobrançosa normalmente produz um número aceitável de flores nas suas panículas, assim como possui boas percentagens de flores perfeitas, ambas condições necessárias para a formação dos frutos na oliveira (Fernandez-Escobar *et al.*, 2008).

As condições meteorológicas que se fizeram sentir no exterior da estufa desempenharam um papel fundamental. Com uma temperatura média de 17,32°C e uma precipitação acumulada de 949,9 mm, este ensaio apresentou valores favoráveis à produção, no entanto devido à susceptibilidade das oliveiras à asfixia radicular, condições anaeróbias do meio podem ter sido particularmente desvantajosas. Poderá ter ocorrido uma oxigenação deficiente da rizosfera potenciada pelo facto do ensaio ter sido em vaso assim como o solo utilizado ser de textura argilosa (unidade Vertissolo). A pequena profundidade e a elevada capacidade de retenção de água do solo podem ter conduzido a uma situação de encharcamento prolongado, que por sua vez conduziu a um desenvolvimento reprodutivo anormal.

4.2.3. Teor de azoto nas folhas

4.2.3.1. Azoto Total

Os teores de azoto total obtidos em ambas as datas de amostragem (Janeiro e Fevereiro de 2010) estão na sua maioria compreendidos dentro do intervalo (1,6 - 2,10%) considerado adequado da fase do repouso invernal nas oliveiras (Fernández-Escobar, 2008; LQARS, 2006; DGADR, 2010). No entanto não se verificaram diferenças nítidas entre os tratamentos. Estes resultados, apresentados no quadro 8, reforçam a ideia geral de que as plantas não sofriam de carências em azoto.

A ligeira diferença entre os valores obtidos em Janeiro e os obtidos em Fevereiro, pode ter sido consequência da maior precipitação que se fez sentir no segundo mês em causa. A intensificação das chuvas terá conduzido a uma maior lixiviação do azoto existente no solo, dificultando a absorção do mesmo por parte da planta.

Também se observou que os teores de azoto total foliar obtidos neste ensaio foram inferiores aos verificados no ensaio A, facto também passível de ser explicado pela precipitação e consequente aumento potencial da lixiviação de N. Enquanto umas oliveiras se encontravam numa bancada móvel (ensaio A), que era deslocada para o interior da estufa sempre que chovesse, o mesmo já não aconteceu às oliveiras do ensaio B, que estavam muito mais sujeitas às condições meteorológicas e mais concretamente à lixiviação do azoto.

As testemunhas deste ensaio (N0) apresentaram teores de azoto superiores àqueles obtidos nas oliveiras sujeitas a tratamento, o que sugere a existência de um efeito de concentração. Apesar de não terem existido diferenças significativas quanto ao crescimento dos lançamentos nas diferentes formulações, as testemunhas tiveram crescimento ligeiramente inferior.

Quadro 8 – Teores de azoto total nas folhas do terço médio dos lançamentos do ano colhidas durante o repouso Invernal (Janeiro e Fevereiro) nas diferentes doses e proporções de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ (100:0, 50:50, 0:100). Cada amostra resultou da mistura de 3 repetições.

Data recolha amostras	Dose de N (kg/ha)	$\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$	% N (m.s)
Jan-10	0	-	2,33
	90	50:50	1,84
	90	100:0	2,07
Fev-10	0	-	2,26
	90	50:50	1,64
	90	100:0	1,98

4.2.3.2. Teores de NH_4^+ e NO_3^- livres nas folhas

As diferentes formulações de azoto não conduziram a diferenças significativas entre os teores foliares de iões azotados livres, o que pode eventualmente ser explicado por ter sido na raiz que se deu maioritariamente a redução do NO_3^- e a assimilação do NH_4^+ .

Ao contrário do que se sucedeu no ensaio A, os valores de NH_4^+ livre obtidos em Janeiro de 2010 foram aproximadamente 1/3 daqueles calculados em Fevereiro de 2010. Também no tratamento N3, com nitrato de amónio as quantidades de NO_3^- livre, observadas em Fevereiro, foram superiores aos 0,01 mg de ião por kg de matéria seca (quadro 9). O aumento da actividade metabólica poderá justificar estes resultados.

Quadro 9 – Valores dos teores foliares de ião amónio e ião nitrato livres nas jovens oliveiras sujeitas a diferentes doses (0, 90 kg/ha) e proporções de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ (100:0, 50:50) colhidas em Janeiro e em Fevereiro de 2010. Letras iguais correspondem à inexistência de diferenças significativas para pares de médias (teste de Schéffé $P=0,05$) (□ Idd significam valores inferiores a 0,01 mg de ião por kg de matéria seca)

Data recolha amostras	Doses de N (kg/ha)	$\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$	N- NH_4^+ (mg kg ⁻¹)	N- NO_3^- (mg Kg ⁻¹)
Jan-10	0	-	46,67	□ 0,01
	90	100:0	62,53	□ 0,01
		50:50	55,95	□ 0,01
Fev-10	0	-	280,05	31,41
	90	100:0	151,12	1,99
		50:50	74,99	4,20

4.2.3.3. Avaliação da actividade enzimática da nitrato-redutase (NR)

À semelhança do que aconteceu no ensaio A, a actividade enzimática da nitrato-redutase nas folhas não foi detectada neste ensaio.

Visto a planta não ter apresentado sintomas de carência de azoto, o que poderia levar à obtenção de resultados semelhantes, a pouca eficácia do meio de extracção e/ou a redução do ião nitrato maioritariamente nas raízes, parecem ser as explicações mais óbvias para a não detecção de actividade enzimática da NR nas folhas.

4.2.3.4. Determinação da actividade da glutamina-sintetase (GS)

A proporção de azoto nítrico e amoniacal adicionada ao solo não influenciou a actividade da glutamina-sintetase nas folhas, visto os valores de glutamil-hidroxamato por proteína total terem sido semelhantes tanto nas folhas de oliveiras testemunha, como naquelas adubadas com 90 kg/ha de nitrato de amónio ou com nitrato de cálcio.

Se a assimilação do ião amónio teve lugar essencialmente nas raízes, a análise da actividade enzimática da GS nas folhas não nos fornece dados suficientes

para a determinação da preferência destas jovens oliveiras quanto ao azoto nítrico e/ou amoniacal. Esta situação também poderá explicar a inexistência de diferenças significativas entre tratamentos.

Quadro 10 - Valores médios do teor de glutamyl-hidroxamato/proteína total nas folhas de oliveiras adubadas com diferentes doses (0, 90 kg/ha) e proporções de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ (100:0, 50:50) colhidas em Fevereiro. Média de 5 árvores por modalidade e dose - letras iguais correspondem à inexistência de diferenças significativas para pares de médias (teste de Schéffé $P= 0,05$)

Dose (kg/ha)	Proporção $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$	Fórmula molecular do composto azotado	Média glutamyl-hidroxamato/proteína total
0	-	-	10,34
90	100:0	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	8,54
	50:50	NH_4NO_3	9,02

4.2.4. Teor de azoto amoniacal e nítrico na água lixiviada

A quantidade de azoto detectada na água lixiviada variou com a forma como o nutriente foi administrado às plantas. Nas oliveiras tratadas com nitrato de amónio observam-se, de um modo geral, menores teores de azoto amoniacal na água das chuvas lixiviadas, relativamente àquelas tratadas com nitrato de cálcio, excepto entre o mês de Outubro e Novembro de 2009, como é possível observar na figura 8. Este pequeno aumento é justificado com o saturar do complexo de troca depois da segunda aplicação de NH_4NO_3 em Outubro e consequente lixiviação do excesso do ião amónio pelas primeiras chuvas (Outubro e Novembro com 64,7 e 89,1 mm de precipitação acumulada respectivamente). Com o começo da Primavera, as condições climáticas de temperatura e humidade poderão ter favorecido reacções de mineralização da matéria orgânica. A repentina formação de ião amónio provavelmente conduziu a um aumento deste catião nos solos. Nesta fase não houve tempo suficiente para a fixação do catião aos minerais argilosos e/ou adsorção do mesmo nas superfícies coloidais, levando a um aumento de NH_4^+ nas águas lixiviadas. Também, algum do NH_4^+ fixado

nos colóides do solo poderá ter sido permutado para a solução do solo e arrastado pela água lixiviada. Estes valores foram no entanto sempre muito baixos.

Enquanto o ião amónio é adsorvido ou fixado na matriz do solo, o ião nitrato permanece em solução, o que o torna muito mais susceptível à lixiviação, situação evidenciada na figura 9, mais propriamente entre Outubro e Dezembro de 2009. Estas perdas acentuadas de azoto nítrico foram mais elevadas nas oliveiras adubadas com nitrato de cálcio, as quais em Novembro e Dezembro representaram 36,54 e 16,57 mg de NO_3^- por litro de água lixiviada respectivamente, enquanto que no tratamento com NH_4NO_3 se mediram 24,0 e 6,35 mg/L.

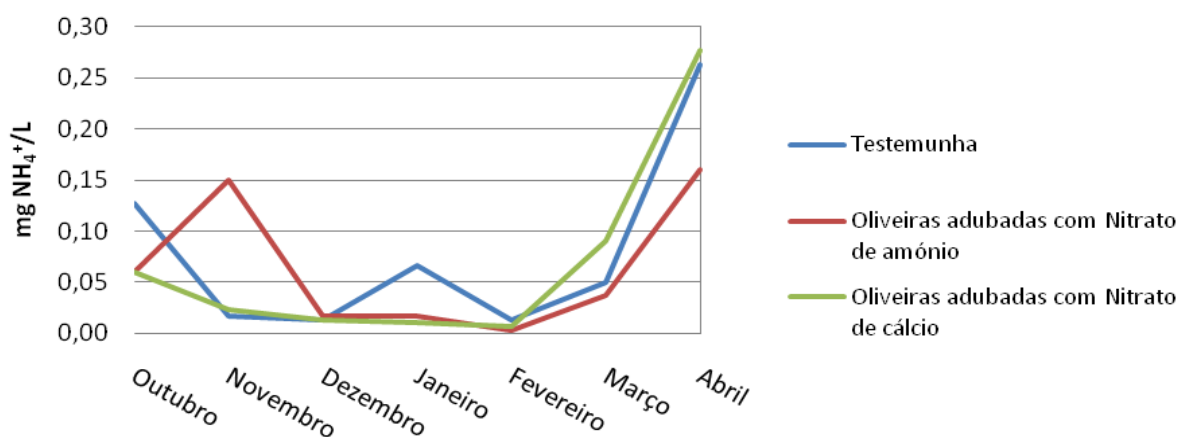


Figura 9 – Concentrações de azoto amoniacal (mg/L) na água lixiviada das oliveiras sujeitas a diferentes tratamentos azotados ao longo de todo o ensaio.

Na adubação com nitrato de cálcio detectaram-se quantidades muito baixas de NH_4^+ na água lixiviada até meados de Fevereiro, começando depois a aumentar. Por esta altura, início de Primavera, provavelmente tal como mencionado anteriormente, algum do NH_4^+ fixado nos colóides do solo poderá ter sido permutado para a solução do solo e arrastado pela água lixiviada.

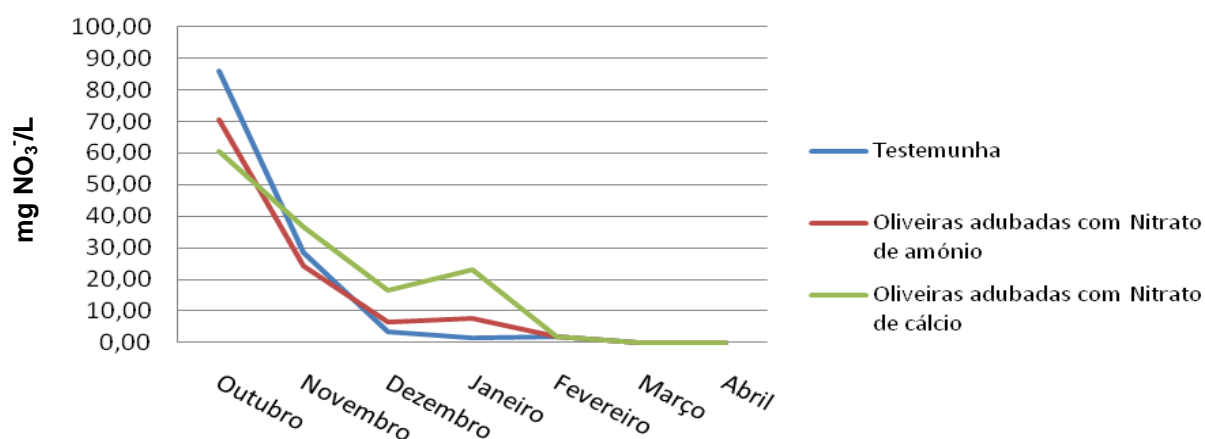


Figura 10 – Concentrações de azoto nítrico (mg/L) na água lixiviada das oliveiras sujeitas a diferentes tratamentos azotados ao longo de todo o ensaio.

A susceptibilidade do ião nitrato à lixiviação é verificada logo nos primeiros meses de recolha da água lixiviada (Outubro, Novembro e Dezembro de 2009), representada na figura 9. O ligeiro aumento da concentração do anião nos lixiviados de Janeiro de 2010, relativamente ao mês anterior (6,5 mg/L nas oliveiras adubadas com $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ e 1,2 mg/L na adubação com NH_4NO_3) terá resultado da diminuição da precipitação acumulada mensal em 25,6% e consequentemente redução do potencial lixiviante.

Com o aproximar dos meses primaveris e com a diminuição das chuvas, todo o pouco ião nitrato disponível para a planta terá sido absorvido pela mesma, daí os teores deste elemento na água lixiviada desde finais de Fevereiro a Abril terem sido tão baixos.

No quadro 11 são retratados os teores médios totais de ião amónio e ião nitrato nas águas lixiviadas por acção da precipitação no período de Outubro a Abril.

Quadro 11 – Teores médios totais de N-NO_3^- e N-NH_4^+ em mg/vaso detectados nas águas lixiviadas das oliveiras sujeitas a diferentes tratamentos azotados ao longo de todo o ensaio.

Doses de N (kg/ha)	$\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$	Teor médio total de N-NO_3^- (mg/vaso)	Teor médio total de N-NH_4^+ (mg/vaso)
0	-	423,46	1,17
90	100:0	462,57	1,11
	50:50	386,93	1,16

De um modo geral o tratamento com nitrato de amónio provou ser menos susceptível que o de nitrato de cálcio a perdas por lixiviação de ião nitrato (Quadro 11). As perdas totais de ião amónio foram reduzidas nos dois casos. Estes resultados estão de acordo com o comumente descrito na literatura (Santos, 1995).

5. CONCLUSÃO

Apesar da forma de fornecimento de azoto à planta ser um tema recorrente em estudos realizados em muitas espécies herbáceas gimnospérmicas e lenhosas angiospérmicas, pouca pesquisa tem sido conduzida na cultura da oliveira. Este trabalho visou aumentar o conhecimento nesta área e, como tal, contribuir para minimizar os custos energéticos da planta, associados à absorção e assimilação do azoto e os impactes ambientais causados pela adubação azotada.

É de salientar que os resultados apresentados neste estudo reportam-se a um ensaio de 15 meses apenas, com jovens oliveiras, levando a crer que as necessidades das árvores podem ter sido satisfeitas quer pelas suas reservas em azoto, quer pelas quantidades deste elemento existentes no solo, não veiculadas pelo adubo. O sistema radicular provavelmente também não estaria completamente desenvolvido limitando a absorção do azoto. Estes terão sido os principais motivos pelos quais os parâmetros biométricos, o teor foliar de azoto, os teores de azoto amoniacal e nítrico livres e a actividade das enzimas nitrato-redutase e glutamina-sintetase, não foram influenciados pelas dosagens de N e proporção de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ estudadas. Uma das outras potenciais razões será a quantidade de azoto reduzido e/ou assimilado nas raízes, provavelmente muito superior aos valores verificados nas folhas.

Apesar de muitos olivicultores ainda acreditarem que aplicações de grandes quantidades de fertilizantes azotados são garantia de boas produções de azeitona, este trabalho dá ênfase à possibilidade de reduzir as aplicações em solos férteis nos primeiros anos de plantação, e talvez fazê-lo sob a forma de nitrato de amónio, obtendo-se as mesmas produtividades. Esta medida contribuirá para a correcção de défices de azoto no solo, ao mesmo tempo que melhora a dinâmica de N na planta e diminui riscos de poluição, uma vez que apesar de não ter contribuído para melhorias significativas em nenhum dos parâmetros em estudo no ensaio A, o nitrato de amónio (NH_4NO_3) demonstrou ser menos susceptível que o nitrato de cálcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$) às perdas por lixiviação do ião nitrato. Em igualdade de circunstâncias fisiológicas, a decisão de qual a forma azotada a aplicar ao solo será totalmente agronómica e irão pesar as condições existentes no olival como a existência ou não de um sistema de rega, a possibilidade de se implementar fertirrega, o tipo de formulações azotadas disponíveis, outros nutrientes a veicular, custos associados, entre outros factores.

Os resultados apresentados são preliminares, requerendo o aumento de número de observações e de ensaios enzimáticos por um período de tempo mais dilatado na cultura da oliveira. A obtenção de valores de referência para a actividade enzimática da GS e da NR, em conjugação com outras técnicas de avaliação do azoto na planta,

nomeadamente a utilização de N marcado, poderá contribuir para o aperfeiçoamento estabelecimento de normas de fertilização azotada em jovens oliveiras em Portugal. Medidas como estas poderão permitir aumentos de produtividade da cultura e diminuição da poluição das águas subterrâneas.

6. BIBLIOGRAFIA

- Abd-Elmoniem, E., Abou-Hadid, A., El-Shinawy, M., El-Beltagy, A. 1996. Effect of nitrogen form on lettuce plant grown in hydroponic system. *Acta Horticulturae* **434**: 47-52.
- Agustí, M. 2004. *Fruticultura*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. 493, 347-361.
- Andrews, M. 1986. The partitioning of nitrate assimilation between root and shoot of higher plants. *Plant Cell Environment* **9**: 511-519.
- Babourina, O., Voltchanskii, K., McGann, B., Newman, I., Rengel, Z. 2007. Nitrate supply affects ammonium transport in canola roots. *Journal of Experimental Botany* **58**: 651-658.
- Bradford, M.M. 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254
- Barranco, D., Fernández-Escobar, R., Rallo, L. 2008. *El cultivo del Olivo*. Ediciones Mundi-Prensa y Junta de Andalucía, Madrid. 846pp.
- Beltrán, G., Uceda, M., Hermoso, M., Frías, L., 2008. Maduración. In: *El Cultivo del Olivo*. Barranco, D., Fernández-Escobar, R., Rallo, L. (6ª Ed.), 846pp. 163-187 Ediciones Mundi-Prensa y Junta de Andalucía, Madrid.
- Bouranis, D.L., Kitsaki, C. K., Tzakosta, A. 2004. Differences in nitrate and ammonium homeostasis of reproductive and vegetative shoots of olive tree cv Kalamon during inflorescence development. *Journal of Plant Nutrition* **27**: 797-813.
- Cardoso, J.C. 1974. A classificação dos solos de Portugal: Nova Versão. *Boletim dos Solos*, nº 17, p.14-46.
- Carranca, C. 2000. Principais processos do ciclo de azoto numa agricultura sustentável. Avaliação através do marcador ¹⁵N. EAN, Oeiras, 118 pp.

- Costa, J.L., Massone, H., Martínez, D., Suero, E.E., Vidal, C.M., Belmar, F. 2002. Nitrate contamination of a rural aquifer and accumulation in the unsaturated zone. *Agricultural Water Management* **57**: 33-47.
- Crawford, N.M. 1995. Nitrate: nutrient and signal for plant growth. *Plant Cell* **7**: 859-868 (citado em Poonnachit, U., Darnell, R. 2004. Effect of ammonium and nitrate on ferric chelate reductase and nitrate reductase in *Vaccinium* Species. *Annals of Botany* **93**: 399-405.).
- Cruz, C., Bio, A.F.M., Domínguez-Valdivia, M.D., Aparicio-Tejo, P.M., Lamsfus, C., Martins-Loução, M.A. 2006. How does glutamine synthetase activity determine plant tolerance to ammonium? *Planta* **223**: 1068-1080.
- Cruz, J.L., Mosquim, P.R., Pelacani, C.R., Araújo, W.L., Damatta, F.M. 2004. Effects of nitrate nutrition on nitrogen metabolism in cassava. *Biologia Plantarum* **48 (1)**: 67-72.
- DGADR. 2010. *Produção Integrada do Olival*. 2ª Ed. DGADR. 97 pp.
- Debouba, M., Gouia, H., Valadier, M.H, Ghorbel, M.H., Suzuki, A. 2006. Salinity-induced tissue-specific diurnal changes in nitrogen assimilatory enzymes in tomato seedlings grown under high or low nitrate medium. *Plant Physiology and Biochemistry* **44**: 409-419.
- Edwards, J., Horton, B.D. 1982. Interaction of peach seedlings to $\text{NO}_3:\text{NH}_4$ ratios in nutrient solutions. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **107**: 142-147.
- FAO. 2006. *World reference base for Soil resources 2006: A framework for international classification, correlation and communication*. World Soil Resources Reports 103. 127pp.
- FAO. 2007. *Informações complementares*. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>. Acesso em: 1/07/2010

- Fernández-Escobar, R. 1994. Fertilización del olivar. *In*: Olivicultura. Ed. Fundación “La caixa” e Agro Latino, s.l., 55-63.
- Fernández-Escobar, R. 2008. Fertilización. *In*: El cultivo del Olivo., Ediciones Mundi-Prensa y Junta de Andalucía, Madrid, 297-336.
- Fernández-Escobar, R., Ortiz-Urquiza, A., Prado, M., Rapoport, H.F. 2008. Nitrogen status influence on olive tree flower quality and ovule longevity. *Environmental and Experimental Botany* **64**: 113-119.
- Fernández-Escobar, R., Marin, L., Sánchez-Zamora, M.A., García-Novelo, J.M., Molina-Soria, C., Parra, M.A. 2009. Long-term effects of N fertilization on cropping and growth of olive trees and on N accumulation in soil profile. *European Journal of Agronomy* **31**: 223-232.
- Ferreira, J., Garcia-Ortiz, A., Frias L., Fernández, A. 1986. Los nutrientes N, P, K en la fertilización del olivar. *Olea* **17**: 141-152.
- Gajewska, E., Sklodowska, M., 2009. Nickel-induced changes in nitrogen metabolism in wheat shoots. *Journal of Plant Physiology* **166**: 1034-1144.
- García, A. 2005. Cultivo moderno do Olival. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. 295, 31.
- García, C.N., Quílez, O.A. 2003. Estrategias de fertilización en el olivar compatibles con el medio ambiente. Proyecto CA097-014
- Glass, A.D.M., Britto, D.T., Kaiser, B.N., Kinghorn, J.R., Kronzucker, H.J., Kumar, A., Okamoto, M., Rawat, S., Siddiqi, M.Y., Unckels, S.E., Vidmar, J. 2002. The regulation of nitrate and ammonium transport systems in plants. *Journal of Experimental Botany* **53**: 370.
- Giménez, C., Díaz, E., Rosado, F., García-Ferrer, A., Sánchez, M., Parra, M.A., Díaz, M., Peña, P. 2001. Characterization of current management practices with high risk of nitrate contamination in agricultural areas of southern Spain. *Acta Hort.* **563**: 73-80.

- Gojon, A., Bussi, C., Grignon, C., Salsac, L. 1991. Distribution of NO₃- reduction between roots and shoots of peach-tree seedlings as affected by NO₃- uptake rate. *Physiol Plantarum* **82**: 505-512.

- González, F., Troncoso, A. 1972. Caracteres físicos y químicos de los suelos ocupados por el olivar (variedades de mesa) en la provincia de Sevilla: Relaciones con el estado nutritivo de la planta: I. Características del “suelo óptimo”. *Anales de Edafología y Agrobiología*: **31**, nº 5-6, 381-393.

- Halfacre, R., Barden, J. 1979. *Horticulture*. McGraw-Hill Books Company. 722 pp.

- Hartmann, H.T., 1958. Some responses of the olive to nitrogen fertilizers. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science* **71**: 257-266.

- Hassan, M.J, Zhang, G., Zhu, Z. 2008. Influence of Cadmium Toxicity on Plant Growth and Nitrogen Uptake in Rice as Affected by Nitrogen Form. *Journal of Plant Nutrition* **31**: 251-262.

- Hessini, K., Lachaal, M., Cruz, C., Soltani, A. 2009. Role of Ammonium to Limit Nitrate Accumulation and to Increase Water Economy in Wild Swiss Chard. *Journal of Plant Nutrition* **32**: 821-836.

- Husted, S., Hebborn, C.A., Mattsson, M., Schjoerring, J.K. 2000. A critical experimental evaluation of methods for determination of NH₄⁺ in plant tissue xylem sap and apoplastic fluid. *Physiologia Plantarum*, **109**: 167-179

- INE. 2010. http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=0000020&contexto=pi&selTab=tab0. Acesso em: 10/01/2011

- INGA, 2004/05. Anuário da campanha 2004/05. Principais ajudas directas. Informações complementares. Disponível em <http://www.inga.min-agricultura.pt/publica/anuario/Anuario2004.pdf>. Acesso em: 24/09/2010

- Jordão, P.V., Marcelo, M.E., Sempiterno, C.M., Henriques, J.G., Fernandes, A., Mateus, J., Soares, F.M., Pinheiro-Alves, M.C. 2004. Influência da aplicação de azoto e boro na produção da oliveira cultivar Galega e na qualidade do azeite. *Revista das Ciências Agrárias* **XXVII**: 444-453
- Kaiser, J.J., Lewis, O.A.M. 1984. Nitrate reductase and glutamine synthetase activity in leaves and roots of nitrate-fed *Helianthus annuus* L. *Plant and Soil* **70**: 127-130.
- Kempers, A. Y., Luft, A. G. 1988. Re-examination of the determination of environmental nitrate as nitrite by reduction with hydrazine. *Analyst*, **113**: 1117-1120
- Kronzucker, H.J., Glass, A.D.M., Siddiqi, M.Y. 1999. Inhibition of Nitrate Uptake by Ammonium in Barley. *Analysis of Component Fluxes. Plant Physiology* **120**: 283-291.
- Lavee, S. 1996. Biología e fisiologia del olivo. *In: Enciclopedia Mundial del Olivo*. Madrid: Consejo Oleícola Internacional. 59-106 *Enciclopedia Mundial da Oliveira*.
- Leitão, P.A., Potes, M.F., Calado, M.F., Almeida, F.J. 1986. Descrição de 22 Variedades de Oliveira Cultivadas em Portugal.- Lisboa: DGPA. 111pp. 50-52.
- Li, B., Xin, W., Sun, S., Shen, Q., Xu, G. 2006. Physiological and molecular responses of nitrogen-starved rice plants to re-supply of different nitrogen sources. *Plant Soil* **287**: 145-159
- Li, X.L., Fan, X.R., Shen, Q.R. 2008. The relationship between rhizosphere nitrification and nitrogen-use efficiency in rice plants. *Plant, Cell and Environment* **31**:73-85.
- Liu, X.Q., Ko, K.Y., Kim, S.H., Lee, K.S. 2008. Effect of Amino Acid Fertilization on Nitrate Assimilation of Leafy Radish and Soil Chemical Properties in High Nitrate Soil. *Soil and Plant Analysis*. **39**: 269-281.

- López-Villalta, L.,C. 1996. Técnicas de produção. *In*: Enciclopedia Mundial del Olivo. Madrid: Consejo Oleícola Internacional. 159-162 Enciclopedia Mundial da Oliveira.

- LQARS. 2006. Manual de fertilização das culturas. INIAP- Laboratório Químico Agrícola Rebelo da Silva, Lisboa. 282 pp

- Marcelo, M.E., Jordão, P.V., Santos, L., Calouro, F. 2005. A fertilização racional do olival. Vida Rural. Abril 37-39

- Marschner, H. 1995. Mineral nutrition of higher plants. Institute of Plant Nutrition. University of Hohenheim. Germany. Academic Press. 904 pp.

- Martins-Loução, M.A., Cruz, C. 1999. The role of N source on carbon balance. Srivastava, H.S., Rana, P. (ed.) Modes of Nitrogen Nutrition in Higher Plants. 1999. Oxford & IBH Publishing Co., New Delhi 231-282 pp

- Mengel, K., Kirkby, E.A. 2001. Principles of plant nutrition. Ed 5. Kluwer Academic Publishers, NL. 894 pp.

- Mifflin, B.J., Habash, D.Z. 2002. The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. Journal of Experimental Botany **53**: 979-987.

- Milheiro, A.V. 1992a. A cultura da Oliveira em Portugal. Gazeta das Aldeias. Janeiro: 32-34.

- Milheiro, A.V. 1992b. A cultura da Oliveira em Portugal. Gazeta das Aldeias. Fevereiro: 32-34.

- Milheiro, A.V. 1992c. Estudos de Nutrição da Oliveira. Gazeta das Aldeias. Março: 27-28.

- Miller, A.J., Fan, X., Shen, Q., Smith, S. 2007. Amino acids and nitrate signals for the regulation of nitrogen acquisition. Journal of Experimental Botany **59**: 111-119.

- Miller, B.D., Hawkins, B.J. 2007. Ammonium and nitrate uptake, nitrogen productivity and biomass allocation in interior spruce families with contrasting growth rates and mineral nutrient preconditioning. *Tree Physiology* **27**: 901-909.
- Min, X., Siddiqi, M.Y., Guy, R.D., Glass, A.D.M., Kronzucker, H.J. 1998. Induction of nitrate uptake and nitrate-reductase activity in trembling aspen and lodgepole pine. *Plant, Cell and Environment* **21**: 1039-1046.
- Montemurro, F., Maiorana, M., Ferri, D., Convertini, G. 2006. Nitrogen indicators, uptake and utilization efficiency in a maize and barley rotation cropped at different levels and sources of N fertilization. *Field Crops Research* **99**: 114-124.
- Neeteson, J.J., Carton, O.T. 2001. The environmental impact of nitrogen in field vegetable production. *Acta Horticulturae*, 563: 21-28.
- Nicodemus, M.A., Francis Salifu K., Jacobs, D.F. 2008. Nitrate reductase activity and nitrogen compounds in xylem exudate of *Juglans nigra* seedlings: relation to nitrogen source and supply. *Trees* **22**: 685-695.
- Poonnachit, U., Darnell, R. 2004. Effect of ammonium and nitrate on ferric chelate reductase and nitrate reductase in *Vaccinium* Species. *Annals of Botany* **93**: 399-405.
- Rallo, L., Martin, G.C. 1991. The role of chilling in releasing olive floral buds from dormancy. *Journal of the American Society of Horticultural Science* **116**: 1058-1062.
- Rallo, L., Cuevas, J. 2008. Fructificación y Producción. In *El cultivo del Olivo*, Barranco, D., Fernández-Escobar, R., Rallo, L. (6ª Ed.), 846pp. 127-162 Ediciones Mundi-Prensa y Junta de Andalucía, Madrid.
- Resende, A.V. 2002. Agricultura e Qualidade da Água: Contaminação da água por nitrato. Planaltina: Embrapa Cerrados. 29 pp.

- Rodrigues, M.A., Velez, J.N., Regato, M.D. 2003. Multiplicação de estacas de oliveira sob nebulização. Actas do III Simpósio Nacional de Olivicultura em Castelo Branco.

- Roosta, H. R., Sajjadinia, A., Rahimi, A., Schjoerring, J. K. 2009. Responses of cucumber plant to NH_4^+ and NO_3^- nutrition: the relative addition rate technique vs. cultivation at constant nitrogen concentration. *Scientia Horticulturae* **121**:397-403.

- Ruan, J., Gerendas, J., Härdter, R., Sattelmacher, B., 2007. Effect of nitrogen form and root-zone pH on growth and nitrogen uptake of tea (*Camellia sinensis*) plants. *Annals of Botany* 99, pg 301-310 (citado em Hessini, K., Lachaal, M., Cruz, C., Soltani, A., 2009. Role of Ammonium to Limit Nitrate Accumulation and to Increase Water Economy in Wild Swiss Chard. *Journal of Plant Nutrition* **32**: 821-836.).

- Rubio-Covarrubias, O.A., Brown, P.H., Weinbaum, S.A., Johnson R.S., Cabrera, R.I., 2009. Evaluating foliar nitrogen compounds as indicators of nitrogen status in *Prunus persica* trees. *Scientia Horticulturae* **120**: 27-33.

- Ruiz, J.M., Castilla N., Romero, L. 2000. Nitrogen Metabolism in Pepper Plants Applied with different Bioregulators. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**: 2925-2929.

- Ruiz, J.M., Rivero, R.M., Romero, L. 2007. Comparative effect of Al, Se, and O toxicity on NO_3^- assimilation in sunflower (*Helianthus annuus* L.) plants. *Journal of Environmental Management* **83**: 207-212.

- Sánchez Pérez, J.M., Antigüedad, I., Arrate, I., García-Linares, C., Morell, I. 2003. The influence of nitrate leaching through unsaturated soil on groundwater pollution in an agricultural area of the Basque country: a case study. *The Science of Total Environment* **317**: 173-187.

- Sánchez, E., Rivero, R.M., Ruiz, J.M., Romero, L. 2004. Yield and biosynthesis of nitrogenous compounds in fruits of green bean (*Phaseolus vulgaris* L cv

- Strike) in response to increasing N fertilisation. *Journal of Science of Food and Agriculture* **84**: 575-580.
- Santos, Q.J. 1995. Fertilização e Poluição Reciclagem Agro-Florestal de Resíduos Orgânicos. Publicações Europa-América, Lisboa. 192, 26-44 pp.
 - SMN, 1965. O Clima de Portugal: Região de Lisboa-Santarém. Fascículo XVI. Lisboa: Serviço Meteorológico Nacional. 116 pp
 - Schepers, J.S. 2008. Nitrogen in Agricultural Systems. W.R Raun Editors. Estados Unidos da América. 947 pp.
 - Schjoerring, J.K., Husted, S., Mäck, G., Matsson, M. 2002. The regulation of ammonium translocation in plants. *Journal of Experimental Botany* **53**: 883-890.
 - Surabhi, G. K., Reddy, A.M., Kumari, G.J., Sudhakar, C. 2008. Modulation in key enzymes of nitrogen metabolism in two high yieldings genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) with differential sensitivity to salt stress. *Environmental and Experimental Botany* **64**: 171-179.
 - Stefanelli, D. 2010. Minimal nitrogen and water use in agriculture: Effects on quality and content of selected nutrients. *Food Research International* (em impressão)
 - Tabatabaei, S.J. 2006. Effects of salinity and N on the growth, photosynthesis and N status of olive (*Olea europaea* L.) trees. *Scientia Horticulturae* **108**: 432-438
 - Tabatabaei, S.J., Yusefi, M., Hajiloo, J. 2008. Effects of shading and NO₃:NH₄ ratio on the yield, quality and N metabolism in strawberry. *Scientia Horticulturae* **116**: 264-272
 - Takei, K., Takahashi, T., Sugiyama, T., Yamaha, T., Sakakibara, H. 2002. Multiples routes communicating nitrogen availability from roots to shoots: a signal transduction pathway mediated by cytokinin. *Journal of Experimental Botany* **53**: 971-978.

- Taiz, L., Zeiger, E. 1998. Plant Physiology. Second Edition. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, EUA: 792pp.
- Tattini, M. 1990. Effect of increasing nutrient concentration on growth and nitrogen uptake of container-grown peach and olive. Plant nutrition- physiology and applications. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands 515-518
- Therios, I.N., Sakellariadis, S.D. 1988. Effects of nitrogen form on growth and mineral composition of olive plants (*Olea europae* L.). Scientia Horticulturae **35**: 167-177.
- Tombesi, A., Michelakis, N., Pastor, M. 1996. Recomendaciones del grupo de trabajo de técnicas de producción en olivicultura y productividad. Olivae **63**: 38-51.
- Touraine, B., 2004. Nitrate uptake by roots – Transporters and Root Development *In* Amâncio, S., Stulen, I. 2004. Nitrogen Acquisition and Assimilation in Higher Plants. Kluwer Academic Publishers. 1-34.
- Traore, A., Maranville, J.W. 1999. Nitrate Reductase Activity of Diverse Grain Sorghum Genotypes and its Relationship to Nitrogen Use Efficiency. Agronomy Journal **91**: 863-869.
- Truax, B., Lambert, F., Gagnon, D., Chevrier, N. 1994. Nitrate reductase and glutamine synthetase activities in relation to growth and nitrogen assimilation in red oak and red ash seedlings: effects of N-forms, N concentration and light intensity. Trees **9**: 12-18.
- Varennes, A. 2003. Produtividade dos solos e ambiente- Macronutrientes na planta. *In*, Escolar Editora, Lisboa 211-253.
- Warren, C.R. 2009. Does nitrogen concentration affect relative uptake rates of nitrate, ammonium, and glycine?. Journal of Plant Nutrition and Soil Science **172**: 224-229